

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**Frecuencia de los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM}
productores de metalo- β -lactamasas en aislamientos de
Pseudomonas aeruginosa no sensibles a carbapenemes
en Lima-Perú**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Paul Alonso Ríos Sanca

ASESORES

Pilar Alva Betalleluz

Edgar Gonzales Escalante

Drake H. Tilley

Lima - Perú

2013

ASESORA:

Lic. T.M. PILAR ALVA BETALLELUZ

Profesor Asociado T.C.; Investigador Permanente del Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” Facultad de Medicina U.N.M.S.M.

COASESORES:

Lic. T.M. EDGAR GONZALES ESCALANTE

Servicio de Microbiología, Instituto Nacional de Salud del Niño

DRAKE H. TILLEY, Jr. MD, MPH&TM

Director del Departamento de Bacteriología del NAMRU-6

LUGAR:

NAVAL MEDICAL RESEARCH UNIT 6 (NAMRU-6)

DEDICATORIA

A mi madre: Reyna Sanca Castro y a mi padre: Victor Ríos Valencia
por su amor y apoyo incondicional

A los familiares y amigos que durante los últimos años se han ido
y a los que están presentes

AGRADECIMIENTOS

Hago un agradecimiento especial a los doctores Drake Tilley y Matthew Kasper, jefes del departamento de Bacteriología en NAMRU-6, quienes me permitieron realizar este trabajo de investigación en su institución.

Gracias a la Blga. Rina Meza, jefe de supervisores del departamento de Bacteriología en NAMRU-6, quien me aceptó como tesista en el laboratorio de Bacteriología.

Gracias a todo el personal de laboratorio de Bacteriología del NAMRU-6: Blgos. Enrique Canal, Maruja Bernal, Yocelinda Meza, Gladys Nuñez, Nereyda Espinoza, Rosa Castillo, Monica Nieto, Nilda Gadea, Luis Aguila y Jesús Rojas, quienes me ayudaron en diferentes aspectos del trabajo de laboratorio con los cuales pude empezar y terminar este trabajo de investigación.

Gracias a la Lic. T.M. Pilar Alva por su ayuda y orientación durante la redacción de este trabajo. Todo mi respeto por su labor.

Gracias al Lic. T.M. Edgar Gonzales por los conocimientos brindados sobre resistencia bacteriana.

Gracias a la Lic. T.M. Meddly Santolalla por su ayuda en la parte estadística y en el desarrollo de resultados.

INDICE

	Pag.
Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
1.1.1. Descripción general.....	3
1.1.2. Significancia Clínica.....	4
1.1.3. Factores de virulencia.....	5
1.1.4. Mecanismos de Resistencia.....	6
1.2. Antibióticos β -lactámicos.....	8
1.2.1. Carbapenemes.....	8
1.3. β -lactamasas.....	9
1.3.1. Metallo- β -lactamasas.....	10
1.3.1.1. Características.....	11
1.3.1.2. Clasificación.....	11
1.3.1.3. Organización Genética.....	12
1.3.1.4. Metallo- β -lactamasas adquiridas.....	13
1.3.1.5. Identificación.....	16
2. Objetivos.....	20
2.1. Objetivo general.....	20
2.2. Objetivo específicos.....	20
3. Métodos.....	21
3.1. Tipo y diseño de investigación.....	21
3.2. Población y muestra.....	21
3.3. Variables.....	21
3.4. Técnicas e instrumentos de medición.....	22
3.5. Plan de procedimientos y análisis de datos.....	23
3.5.1. Recolección de los aislamientos.....	24
3.5.2. Identificación de los aislamientos.....	24
3.5.3. Almacenamiento de los aislamientos.....	24

3.5.4. Reactivación de los aislamientos.....	24
3.5.5. Determinación de la susceptibilidad a antibióticos.....	25
3.5.6. Detección fenotípica de las Metallo- β -lactamasas.....	25
3.5.7. Detección de los genes codificantes de Metallo- β -lactamasas.....	25
3.5.8. Análisis estadístico.....	27
3.6. Aspectos éticos.....	28
4. Resultados.....	29
5. Discusión.....	33
6. Conclusiones.....	36
7. Recomendaciones.....	37
8. Referencias Bibliográficas.....	38
9. Anexos.....	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Procedencia de los 149 aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pag. 29
Tabla 2. Origen por muestras de los 149 aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pag. 29
Tabla 3. Detección molecular de genes codificantes de MBL en 149 aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pag. 30
Tabla 4. Frecuencia del gen <i>bla</i> _{IMP} por hospitales.....	pag. 31
Tabla 5. Perfil de susceptibilidad a antibióticos en 149 aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pag. 31
Tabla 6. Perfil de susceptibilidad a antibióticos en 28 aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productores de MBL.....	pag. 32
Tabla 7. Detección fenotípica de MBL en 149 aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pag. 32

INDICE DE FOTOS

- Foto 1:** Incubación de placas para la prueba de susceptibilidad a antibióticos de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*.....pag. 56
- Foto 2:** Método de Kirby – Bauer en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* MDR productor de Metallo- β -lactamasa que presenta una resistencia marcada a imipenem de 6mm (flecha negra) y es sensible al aztreonam (ATM) (flecha roja).....pag. 56
- Foto 3:** Método de aproximación de discos en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* productor de Metallo- β -lactamasa. Se observa claramente un sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ) y EDTA (halo claro).....pag. 57
- Foto 4:** Método de aproximación de discos en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* productor de Metallo- β -lactamasa. Se observa un sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ) y EDTA.....pag. 57
- Foto 5:** Método de aproximación de discos en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* productor de Metallo- β -lactamasa. Se observa un sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ) y EDTA.....pag. 58
- Foto 6:** Método de aproximación de discos en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* productor de Metallo- β -lactamasa. Se observa un sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ), imipenem (IPM) y EDTA.....pag. 58
- Foto 7:** Método de aproximación de discos en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* productor de Metallo- β -lactamasa. Se observa un sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ), imipenem (IPM) y EDTA.....pag. 59

Foto 8: Método de aproximación de discos *Pseudomonas aeruginosa* productor de Metallo- β -lactamasa. Se observa un sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ), imipenem (IPM) y EDTA.....pag. 59

Foto 9: Método de aproximación de discos en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*. Se observa un falso sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ) y EDTA.....pag. 60

Foto 10: Método de aproximación de discos en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*. No se observa sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ), imipenem (IMI) y meropenem (MEM) con el disco de EDTA.....pag. 60

Foto 11: Imagen del gel de electroforesis correspondiente al PCR multiplex. Los amplicones de las muestras (codificadas con las letras MBL) corresponden al gen *bla*_{IMP} de 232 pb. *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM}: Controles positivos. ATCC 27853: Control negativo. Ladder 123: Marcador de peso molecular de 123 bp.....pag. 61

GLOSARIO

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Aislamiento: Bacteria de género y especie conocidos.

ATS: Agar tripticasa de soya.

Beta-lactámicos: Amplia familia de antibióticos con anillo betalactámico que actúan inhibiendo la síntesis de pared bacteriana.

Carbapenemasas: β -lactamasas que se agrupan en las diferentes clases moleculares de Ambler (A,B y D) y tienen la capacidad de hidrolizar carbapenemes.

Crioconservación: Preservación de material biológico por congelación.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

Fenotipo: Característica (s) observable (s) que tipifica (n) a un organismo de acuerdo a parámetros establecidos. Es la expresión del genotipo.

Gen: Es una secuencia ordenada de nucleótidos en la molécula de ADN que contiene la información necesaria para la síntesis de una proteína con función celular específica.

IMP: Imipenemasa.

MBL: Metallo- β -lactamasa.

MDR: Multidrogoresistencia.

NDM: New Delhi Metallo- β -lactamasa.

PCR multiplex: Variante de PCR que puede amplificar simultáneamente varios blancos de interés en una sola reacción usando más de un par de primers.

VIM: Verona Imipenemasa.

RESUMEN

Introducción: Las Metallo- β -lactamasas (MBL) han emergido como uno de los principales mecanismos de resistencia adquirida en *Pseudomonas aeruginosa*. Son las carbapenemasas de mayor diversidad molecular y de mayor amenaza clínica, representando un riesgo epidemiológico debido a su habilidad de hidrolizar la mayoría de antibióticos β -lactámicos, incluyendo los carbapenemes. Las más importantes por su diseminación epidemiológica y relevancia clínica son las MBL tipo IMP, VIM y NDM, codificadas por los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM} respectivamente.

Objetivo: Determinar la frecuencia de los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM} productores de Metallo- β -lactamasas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* no sensibles a carbapenemes.

Metodología: Se recolectaron 149 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de muestras clínicas de los siguientes nosocomios: Hospital Nacional Daniel A. Carrión, Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins – ESSALUD, Hospital Alberto Sabogal Sologuren – ESSALUD, Hospital General Fuerza Aérea Peruana (FAP) y el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé. Los aislamientos se almacenaron en el cepario del NAMRU-6 desde julio del 2010 hasta julio del 2012. Se realizó el perfil de susceptibilidad a antibióticos mediante el método de “Kirby – Bauer” de acuerdo a los lineamientos del CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). La detección fenotípica de MBL se realizó mediante el método de aproximación de discos de EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) y la detección de los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM} mediante un PCR multiplex.

Resultados: En 28 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* se detectó la presencia del gen *bla*_{IMP} mediante PCR, siendo la frecuencia de este gen 18.8%. No se detectaron los genes *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM}.

Conclusiones: La detección de los genes productores de MBL por PCR permitió detectar la frecuencia real de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de MBL.

1. INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista, conocido por causar infecciones nosocomiales, las cuales son difíciles de tratar, en especial en las unidades de cuidados intensivos (UCI) y en las unidades de quemados. Pueden causar infección en pacientes hospitalizados predominando en: Neumonía, infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel y de tejidos blandos. Las opciones terapéuticas en *Pseudomonas aeruginosa* generalmente son escasas debido a que esta bacteria posee una resistencia inherente a algunas drogas y además tiene la habilidad de adquirir resistencia contra varias clases de drogas.¹

Las MBL han emergido como uno de los principales mecanismos de resistencia adquirida en *Pseudomonas aeruginosa*, ya que son las carbapenemasas de mayor diversidad molecular y de mayor amenaza clínica, representando un riesgo epidemiológico debido a su habilidad de hidrolizar la gran mayoría de antibióticos β -lactámicos, incluyendo los carbapenemes. Además frecuentemente están asociados con resistencia a aminoglucósidos. Los genes que las codifican comúnmente son transferidos horizontalmente por elementos móviles como plásmidos. La expresión fenotípica de las MBL puede determinarse en un laboratorio de Microbiología usando agentes quelantes como el EDTA, también puede usarse técnicas de Biología molecular para detectar la presencia de los genes que codifican las MBL.²

La primera MBL mediada por plásmidos en *Pseudomonas aeruginosa* fue reportada en Japón en 1991.³ Actualmente las MBL se han reportado en Europa, Norteamérica, Oceanía y Latinoamérica. En Latinoamérica las MBL no habían sido reportadas hasta el 2002 cuando el Programa Internacional de Vigilancia Antimicrobiana (SENTRY) reportó en Brasil la MBL tipo SPM-1 en *Pseudomonas aeruginosa*.⁴ Asimismo el SENTRY en el 2004 reportó al gen *bla_{VIM}* codificante para la MBL VIM-2 en un aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* procedente de un hemocultivo en un hospital de Chile y en 3 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes del tracto respiratorio en un hospital de Venezuela, los aislamientos fueron resistentes a imipenem y positivos para la detección fenotípica de MBL por el método de aproximación de discos de: EDTA, imipenem, meropenem y ceftazidima.⁵ Algunas MBL fueron

detectadas en diferentes especies bacterianas en Brasil, Chile y Venezuela; indicando una rápida diseminación de los genes codificantes de MBL en hospitales de Latinoamérica.^{6,7}

A partir del primer reporte de MBL en Latinoamérica, se han publicado varios reportes en América del Sur. El gen *bla_{VIM}* ha sido reportado entre el año 2004 al 2011 en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* en los países de Colombia (2004 y 2006), Argentina (2006), Chile (2008), Venezuela (2009), Brasil (2010) y Uruguay (2011) con frecuencias que van del 5.8% al 18.6%.⁸⁻¹⁴ El gen *bla_{IMP}* ha sido reportado en el 2007 en Brasil y en el 2008 en Argentina con frecuencias de 5.4% y 13.9% respectivamente.^{15,16} En Perú existe un reporte del gen *bla_{IMP}* en el Instituto nacional de salud del niño (2011) con una frecuencia del 10.9%.¹⁷

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

1.1.1. Descripción General

Pseudomonas significa “falsa unidad”, del griego pseudo, que significa “falso”, y monas, que significa unidad simple.¹⁸ El género *Pseudomonas* pertenece al dominio Bacteria, phylum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Pseudomonadales y familia Pseudomonaceae; compuesto de unas 60 especies.¹⁹ Palleroni a principios de 1970 describió cinco grupos de *Pseudomonas* basado en pruebas de hibridación rRNA–DNA. Hoy en día solamente el grupo I de rRNA corresponde al género *Pseudomonas*.²⁰

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo con forma de bastón o ligeramente curvado de 0,5 a 1,0 por 1,5 a 5,0 µm de tamaño, móvil, con uno o varios flagelos polares. Tiene un metabolismo aerobio estricto con oxígeno como aceptor final de electrones, aunque en algunos casos puede usar nitrato como aceptor final de electrones lo que le permite un crecimiento anaerobio.^{21,22} Produce un pigmento amarillo - verde hidrosoluble que fluoresce bajo luz UV, la pioverdina, y un pigmento fenazínico hidrosoluble verde, la piocianina.²³ Más del 95% de los aislamientos de

Pseudomonas aeruginosa recuperados de muestras clínicas pueden identificarse si se observan características como: Crecimiento a 42 °C, colonias grandes con aroma a uvas, presencia de pigmentos piocianina o pioverdina, y prueba de oxidasa positiva. ²² *Pseudomonas aeruginosa* puede utilizar una amplia variedad de nutrientes además de ser hidrofílica por lo que puede residir en una variedad de ambientes naturales y domésticos como: Plantas, bañeras, soluciones de lentes de contacto; ambientes hospitalarios como: Duchas, lava manos, sanitarios, desinfectantes, equipos de terapia respiratoria, endoscopios, batas, piscinas de hidroterapia, equipos de limpieza, etc, además raramente coloniza la flora normal de personas saludables. ²⁴

1.1.2. Significancia Clínica

Pseudomonas aeruginosa se mantiene como el mayor patógeno relacionado a infecciones intrahospitalarias y está asociado con una significativa mortalidad y morbilidad. Las personas con el sistema inmune intacto no tienen el riesgo de ser infectados por *Pseudomonas aeruginosa*, pero los pacientes que tienen el sistema inmune comprometido, especialmente los que presentan una neutropenia inducida por quimioterapia (pacientes con cáncer) pueden ser infectados debido a que esta bacteria es un patógeno oportunista. Algunas de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* son reportadas en la comunidad, estas incluyen foliculitis, síndrome del pie caliente y exposición al agua en bañeras o jacuzzis. ²⁴ Las tasas de colonización representativa en humanos son 0 a 2% en piel, 0 a 3.3% en la mucosa nasal, 0 a 6.6% en la faringe y 2.6 a 24% en muestras de heces, pero las tasas de colonización pueden exceder el 50% durante la hospitalización. ²⁵

La mayoría de infecciones serias por *Pseudomonas aeruginosa* ocurren en instalaciones de salud e incluyen bacteriemia, neumonía, urosepsis e infecciones en heridas incluyendo quemaduras por lo que una brecha física en la defensa de un paciente como incisión quirúrgica, inserción de catéteres vasculares y urinarios e intubación endotraqueal, lo predispone a una infección. Los pacientes de la UCI presentan el riesgo de adquirir estas infecciones, en parte debido a la presencia de dispositivos invasivos y por la comorbilidad. La mortalidad atribuida a infección por *Pseudomonas aeruginosa* como neumonía asociada a ventilación o bacteriemia es importante especialmente en pacientes que reciben una terapia empírica, además *Pseudomonas aeruginosa* puede

causar conjuntivitis a través del uso de lentes de contactos, meningitis, otitis externa en diabéticos, sepsis y meningitis en recién nacidos, endocarditis u osteomielitis en usuarios de drogas intravenosas, neumonía adquirida en la comunidad en pacientes con alguna enfermedad pulmonar como fibrosis quística, infecciones en el tracto urinario y peritonitis.¹

El Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales en Estados Unidos reportó de 1986 al 2003 a *Pseudomonas aeruginosa* como la segunda causa más común de neumonía (18.1%), la tercera causa más común de infecciones del tracto urinario (16.3%) y el octavo patógeno aislado con mayor frecuencia del torrente sanguíneo (3.4%).²⁶

Existen varios reportes de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo resistentes (MDR) a nivel mundial. En la mayoría de estudios publicados la multidrogo resistencia ha sido definida como la resistencia hacia al menos tres drogas de diferentes familias de antibióticos, principalmente aminoglucósidos, betalactámicos (penicilinas anti-pseudomonas, cefalosporinas, carbapenemes) y fluoroquinolonas, pero no existe un consenso internacional establecido.²⁷

1.1.3. Factores de Virulencia

Pseudomonas aeruginosa posee un amplio arsenal de factores de virulencia lo que explica en parte el rango amplio de infecciones causadas por esta bacteria. Posee diferentes sistemas de exportación que están involucrados en la secreción de factores de virulencia; de particular importancia es el sistema de secreción tipo III el cual permite la inyección de proteínas efectoras directamente dentro del citoplasma de las células. Cuatro proteínas efectoras han sido identificadas: ExoS y ExoT, que son enzimas bifuncionales, con actividad de proteína activadora de GTPasa y actividad ADP ribosil transferasa (llegan a causar disrupción del citoesqueleto de la célula); ExoU, una exotoxina con actividad fosfolipasa y ExoY, una adenilato ciclasa; diferentes combinaciones de estas proteínas pueden tener efectos devastadores en la función de la barrera epitelial. Otros factores de virulencia que posee son: Los pili que permiten la adhesión a los receptores del gangliósido GM-1 presente en la superficie de las células epiteliales, la neuraminidasa que elimina ácido siálico y residuos de gangliosido GM-1

facilitando la unión de los pili, el lipopolisacárido que produce endotoxina y es la causa del síndrome séptico, la exotoxina A que produce destrucción tisular e inhibición de la síntesis de proteínas, la enterotoxina que interrumpe la actividad gastrointestinal normal produciendo diarrea, la exoenzima S que inhibe la síntesis de proteínas, la fosfolipasa C que destruye la membrana citoplasmática, el surfactante pulmonar que inactiva las opsoninas, la elastasa que degrada las Inmunoglobulinas y los componentes del Complemento, la leucocidina que inhibe la función de los neutrófilos y linfocitos, la piocianina que suprime el desarrollo de otras bacterias y elimina la actividad de los cilios respiratorios, el alginato que es el polisacárido capsular que permite a la bacteria adherirse a las superficies epiteliales pulmonares que a su vez la protegen contra los antibióticos y el sistema inmune del huésped, además cuando produce cantidades altas de alginato se le considera como un morfotipo mucóide que puede presentarse en pacientes con fibrosis quística.²² La habilidad de *Pseudomonas aeruginosa* para formar películas biológicas es importante para que pueda permanecer en ciertos ambientes y así llega a formar una compleja masa de células unidas a una superficie, de esa manera puede ser más resistente a los biocidas que cuando está en un estado normal, lo cual podría tener consecuencias significantes para un régimen de limpieza hospitalario.¹

1.1.4. Mecanismos de Resistencia

Pseudomonas aeruginosa tiene dos mecanismos principales de resistencia intrínseca: Una β -lactamasa AmpC cromosómica inducible y varios sistemas de bombas de expulsión; además la permeabilidad de su membrana externa es baja, unas 12 a 100 veces menos que la de *E. coli*.²⁸

La β -lactamasa AmpC, que es una cefalosporinasa de la clase molecular C de Ambler, está comúnmente ligada a la resistencia de β -lactámicos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. No todos los β -lactámicos son inductores efectivos de la β -lactamasa AmpC cromosómica, por ejemplo imipenem es un buen inductor, mientras que las cefalosporinas de tercera y cuarta generación son pobres inductores.²⁹

Cinco familias de sistemas de bombas de expulsión han sido descritas, siendo la familia de resistencia-nodulación-división (RDN) el mayor contribuyente a la resistencia a antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa*. Hay 12 sistemas de expulsión de tipo RDN

presentes en *Pseudomonas aeruginosa*, de los cuales MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexXY-OprM acoplan y proveen resistencia a β -lactámicos, además el sistema MexEF-OprN y los mencionados anteriormente permiten resistencia a fluoroquinolonas. MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexXY-OprM acoplan carbapenemes (excepto imipenem) siendo MexAB-OprM el mejor exportador de estos agentes y reduce la susceptibilidad a meropenem en aislados clínicos.^{29,30}

Pseudomonas aeruginosa presenta dos mecanismos de resistencia adquirida: Una transferencia horizontal de elementos genéticos y una resistencia mutacional.²⁸ En la transferencia horizontal de elementos genéticos, elementos de ADN como plásmidos, transposones e integrones llevan genes de resistencia a antibióticos y pueden ser adquiridos por conjugación, transformación o transducción; esto confiere resistencia que afecta principalmente a aminoglucósidos y β -lactámicos. Algunos aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* adquieren plásmidos que llevan genes codificantes de β -lactamasas que confieren resistencia a penicilinas y cefalosporinas, como las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y las MBL que inactivan carbapenemes.²⁸

Un mecanismo de resistencia importante es la hiper expresión de los sistemas de bombas de expulsión de *Pseudomonas aeruginosa* como MexAB-OprM y MexCD-OprJ, debido a mutaciones en los genes reguladores *mexR* y *nfxB* respectivamente, además la hiper expresión del sistema MexXY-OprM por la mutación en el gen *mexZ* permite una resistencia a aminoglucósidos, fluoroquinolonas y cefepime. Mutaciones en la porina OprD (mayor “portal” para entrada de carbapenemes) altera la permeabilidad y reduce la concentración de imipenem lo que tiene como resultado resistencia a este antibiótico y es el mecanismo de resistencia más común a carbapenemes. Mutaciones en los genes *mexT* o *mexS* reducen la expresión de la porina OprD y permiten la hiperexpresión de las bombas de expulsión MexEF-OprN, lo que resulta en la resistencia a imipenem y otros antibióticos. La hiperproducción de β -lactamasas ocurre por mutación de un efector de la β -lactamasa AmpC y AmpD que controlan actividad del regulador AmpR. Mutaciones en *gyrA* y *gyrB* (girasa) así como en *parC* y *parE* (topoisomerasa IV) reducen afinidad de unión a fluoroquinolonas lo que conlleva a su resistencia.²⁸

Pseudomonas aeruginosa presenta una resistencia adaptativa, la cual es inducible y dependiente de la presencia de algún antibiótico u otro estímulo ambiental, varios factores son reconocidos por inducir este tipo de resistencia incluyendo antibióticos, biocidas, poliaminas, pH, anaerobiosis, cationes y fuentes de carbón. Estos modulan la expresión de varios genes que afectan las bombas de expulsión, la envoltura celular y enzimas.²⁸

Los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* MDR típicamente exhiben simultáneamente varios mecanismos de resistencia. La resistencia adquirida a β -lactámicos a veces es resultado de la represión de la AmpC cromosómica o adquisición de β -lactamasas plasmídicas, la resistencia a fluoroquinolonas comúnmente es causada por bombas de flujo además de la girasa y topoisomerasa IV, la resistencia a carbapenemes se debe principalmente a la reducción de la expresión de la porina OprD, además las bombas de flujo y las β -lactamasas juegan roles secundarios importantes, especialmente en la resistencia a meropenem.³¹ Las polimixinas, representados principalmente por la polimixina B y la polimixina E (colistina), así como la Tigeciclina han ganado un rol importante en las infecciones MDR.³²

1.2. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Son un grupo de antimicrobianos que presentan un anillo β -lactámico en su estructura molecular y que tienen como principal mecanismo de acción efectos sobre la integridad de la pared celular y por consiguiente la destrucción de la bacteria que comprenden un amplio grupo que incluye derivados de la penicilina, cefalosporinas, monobactams, carbapenemes e inhibidores de β -lactamasas.²²

1.2.1. Carbapenemes

Los carbapenemes son antibióticos β -lactámicos con un amplio espectro de actividad que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana; son estables a la mayoría de β -lactamasas incluyendo β -lactamasas de tipo AmpC y BLEEs. La resistencia a carbapenemes ocurre cuando las bacterias desarrollan cambios en la estructura de sus proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), cuando adquieren MBL que tienen la capacidad de degradar rápidamente estos antibióticos o cuando hay cambios en

la permeabilidad de sus membranas. Los carbapenemes (imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem) poseen un amplio espectro de actividad in vitro contra varias bacterias Gram positivas, Gram negativas y anaerobios, pero carecen de actividad contra *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR) y *Stenotrophomonas maltophilia*, además los carbapenemes son considerados dentro de la práctica clínica como la opción terapéutica en infecciones bacterianas severas causadas por aislamientos bacterianos MDR.³³

Los carbapenemes tienen una actividad bactericida uniéndose a las PBP's en *Pseudomonas aeruginosa*. Imipenem se une preferentemente a PBP2 seguido por PBP1a, PBP1b y tiene una afinidad débil por PBP3, mientras que Meropenem se une fuertemente a PBP2 seguido por PBP3, PBP1a y PBP1b.³³ La reducción de OprD y la sobreexpresión de bombas de expulsión activa MexAB-OprM son los mecanismos de resistencia más frecuentes a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa*.³⁴

1.3. β -LACTAMASAS

Las β -lactamasas son enzimas que tienen la capacidad de degradar el enlace amida del anillo β -lactámico por lo cual confieren resistencia a diferentes antibióticos β -lactámicos. Existen dos maneras de clasificar las β -lactamasas; la clasificación molecular (estructural), basada en la secuencia de sus aminoácidos, que las divide en clase A, C, D (serin-enzimas) y clase B (metalo-enzimas)³⁵; la clasificación funcional basada en los perfiles de los sustratos que hidrolizan y en la inhibición de su actividad por inhibidores las divide en grupo 1 (clase C) cefalosporinasas, grupo 2 (clase A y D) serin- β -lactamasas y grupo 3 (clase B) MBL (**Ver anexo 1**).³⁶ Las β -lactamasas con capacidad de degradar carbapenemes (llamadas carbapenemasas) pueden degradar frecuentemente otros antibióticos β -lactámicos, se encuentran en las clases moleculares A, D y B y pueden encontrarse en patógenos de importancia clínica (**Ver anexo 1**).³⁷

En la clase A se encuentran principalmente las β -lactamasas de tipo TEM, SHV y CTX-M, las cuales han sido reportadas en *Pseudomonas aeruginosa* pero con una mayor frecuencia en Enterobacterias. Las β -lactamasas con capacidad de degradar carbapenemes que se encuentran en la Clase A pertenecen al grupo 2f de la clasificación funcional de Bush y comprenden cinco grupos: SME, IMI, NMC, KPC y GES, de los

cuales SME, IMI y NMC son de codificación cromosomal y no han sido reportadas en el género *Pseudomonas*, mientras que las variantes KPC-2 y KPC-5 de codificación plasmídica han sido descritas en *Pseudomonas aeruginosa*. Además las variantes de GES: GES-2 y GES-5 con actividad carbapenemasa, han sido reportadas en *Pseudomonas aeruginosa*.³⁷

En la clase C se encuentran las β -lactamasas de tipo AmpC que contribuyen a la resistencia de penicilinas y cefalosporinas así como a los inhibidores de β -lactamasas. La hiperproducción de AmpC en *Pseudomonas aeruginosa* generalmente confiere resistencia a ceftazidima.²⁹

Las β -lactamasas de la clase D, llamadas OXA, se caracterizan por hidrolizar oxacilinas y benzilpenicilinas. Algunas son de origen cromosómico, mientras que la mayoría son de origen plasmídico. En *Pseudomonas aeruginosa* una de las variantes de OXA (OXA-40) tiene la capacidad de degradar carbapenemes.³⁸

1.3.1. Metallo- β -lactamasas

Las MBL, que pertenecen a la clase B de la clasificación molecular de Ambler, son el grupo más relevante de carbapenemasas, tanto por la diversificación existente debido a diferentes variantes de aminoácidos, como por su diseminación mundial en diferentes microorganismos.³⁸ Las MBL fueron descubiertas a mediados de los 60 y fueron detectadas solamente en especies con baja patogenicidad; en los 90, con la expansión de genes que codifican MBL en elementos de ADN móviles entre patógenos Gram negativos, estas enzimas han incrementado su importancia clínica³⁹, son más frecuentes en *Pseudomonas aeruginosa*, los cuales son más resistentes a carbapenemes que las Enterobacterias con las mismas enzimas, debido a su impermeabilidad y actividad de expulsión.⁴⁰

Los pacientes que presentan una infección con *Pseudomonas aeruginosa* productora de alguna MBL presentan una mayor mortalidad que los pacientes que tienen una infección con *Pseudomonas aeruginosa* no productora de MBL.⁴¹ Aztreonam y piperacilina-tazobactam quizá pueden ser opciones efectivas para un tratamiento de *Pseudomonas aeruginosa* productora de alguna MBL si es presentan sensibilidad in vitro.⁴²

1.3.1.1. Características

Las MBL tienen la capacidad de romper el enlace amida del anillo β -lactámico ⁴³ (Ver figura 1), además tienen la característica marcada de ser inhibidas por EDTA u otros agentes quelantes de cationes divalentes pero estos no tienen significancia clínica al no poder usarse como terapia. ⁴⁴

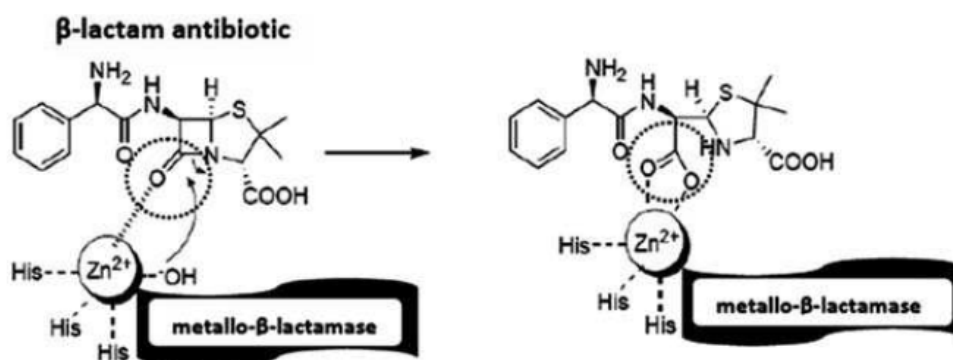


Figura 1: Mecanismo de hidrólisis de antibióticos betalactámicos a través de Metallo- β -lactamasas (Folia Histochem. Cytobiol, 2008: 46 (2) 137 – 142)

Todas las MBL comparten características funcionales como potente actividad carbapenemasa, resistencia a inhibidores de β -lactamasas (como el ácido clavulánico) y ausencia de actividad contra monobactámicos (como el aztreonam). La actividad contra los sustratos varía desde un rango estrecho (por ejemplo la MBL CphA de *Aeromonas hydrophila*) hasta un rango extenso (por ejemplo la MBL tipo VIM, la cual puede degradar casi todos los antibióticos β -lactámicos). La actividad carbapenemasa de las MBL y su resistencia a inhibidores de β -lactamasas son las características clínicas más preocupantes. ³⁹

1.3.1.2. Clasificación

Las MBL pertenecen al grupo 3 de la clasificación funcional y son divididos en 3 subgrupos (3a, 3b y 3c) en base a la hidrólisis del imipenem y otros β -lactámicos. ³⁶ En el subgrupo 3a las enzimas hidrolizan penicilinas igual o más rápido de lo que hidrolizan imipenem y tienen un amplio espectro de actividad, además las cefalosporinas son también hidrolizadas por estas enzimas, en el subgrupo 3b las

enzimas tienen alta especificidad por los carbapenemes y en el subgrupo 3c las enzimas tienen alta actividad cefalosporinasa.⁴⁵

Las MBL pertenecen a la clase B de la clasificación molecular y son clasificados en 3 subclases (B1, B2 y B3) en base a sus características estructurales y la afinidad del Cinc por los dos sitios de unión que tiene la enzima.³⁵ En las enzimas de la subclase B1 y B3 el sitio activo contiene 2 iones Cinc, en la subclase B2 el sitio activo contiene solamente un ion Cinc.⁴⁵

Las MBL pueden ser codificadas por genes que pertenecen al ADN cromosómico (MBL residentes o intrínsecas) o por genes adquiridos por transferencia horizontal (MBL adquiridas).³⁹ Sólo unas cuantas MBL intrínsecas se encuentran en especies de importancia clínica como *Bacillus spp*, *Stenotrophomonas maltophilia*, varias especies de *Aeromonas*, *Bacteroides fragilis* y *Pseudomonas otiditis*. La capacidad de codificar MBL cromosómicas tiene diversos argumentos, como el periodo de tiempo en que las bacterias han sido expuestas a los β -lactámicos, por lo cual adquiere esta información en sus genes para expresar la resistencia al antibiótico. Otro argumento es que estas enzimas realizan una función celular normal como respuesta al ambiente.² Las MBL adquiridas han sido detectadas en aislamientos de Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otras bacterias Gram negativas no fermentadoras y casi todas pertenecen a la subclase B1.³⁹

1.3.1.3. Organización Genética

La mayoría de las bacterias de importancia clínica llevan los genes codificantes de MBL como cassettes genéticos en integrones de clase 1, que son unidades genéticas que contienen los componentes de un sistema de recombinación específico de sitio que moviliza, reconoce y captura genes de resistencia a antibióticos en elementos móviles llamados cassettes genéticos, de esta manera los aislamientos productores de MBL exhiben fenotipos multirresistentes incluyendo a antibióticos no β -lactámicos⁴⁶, por ejemplo frecuentemente se encuentra resistencia a los aminoglucósidos, comprometiendo así el régimen terapéutico.⁴⁷

La estructura mínima de un integron incluye: El gen que codifica la enzima integrasa (intI), un sitio adyacente de recombinación (attI) donde se unen los cassettes

genéticos y al menos un promotor que transcriba la integrasa y que dirija la transcripción de los cassettes integrados.⁴⁸ Los integrones no presentan la maquinaria necesaria para movilizarse de un organismo a otro por si solos, pero pueden asociarse a plásmidos y transposones para tal fin. La mayoría de genes que codifican las MBL son encontrados en plásmidos usualmente entre 120 y 180 kb.²

Los cassettes genéticos son pequeños ADN circulares (cerca de 1kb) que comprende un gen de resistencia, es decir, sólo un marco de lectura abierta completo (orf), además posee un sitio de recombinación específico (sitio de reconocimiento de la integrasa) denominado elemento de 59 pb, localizado en el extremo 3' del gen. Los cassettes genéticos pueden movilizarse de un integron a otro pero no de un organismo a otro.⁴⁸

1.3.1.4. Metallo-β-lactamasas adquiridas

Al menos 9 tipos diferentes de MBL adquiridas han sido descritas: IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM, KHM y NDM (**Ver figura 2**). Las más importantes por su diseminación epidemiológica y relevancia clínica son las enzimas tipo IMP, VIM y NDM codificadas por los genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* y *bla_{NDM}* respectivamente.³⁹ Algunas MBL adquiridas predominan en ciertas regiones, tal es el caso de la SPM - 1 (Sao Paulo Metallo-β-lactamasa) identificada en Brasil en 1997 en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*; en su secuenciamiento se identificó una diferencia no mayor de 24 aminoácidos en comparación con IMP y VIM; además está asociada a regiones comunes y no a integrones o transposones.⁴ La GIM-1 (Imipenemasa Alemania) predomina en Alemania y presenta una diferencia en su estructura genética del 31% al 41% con respecto a IMP y VIM.⁴⁹

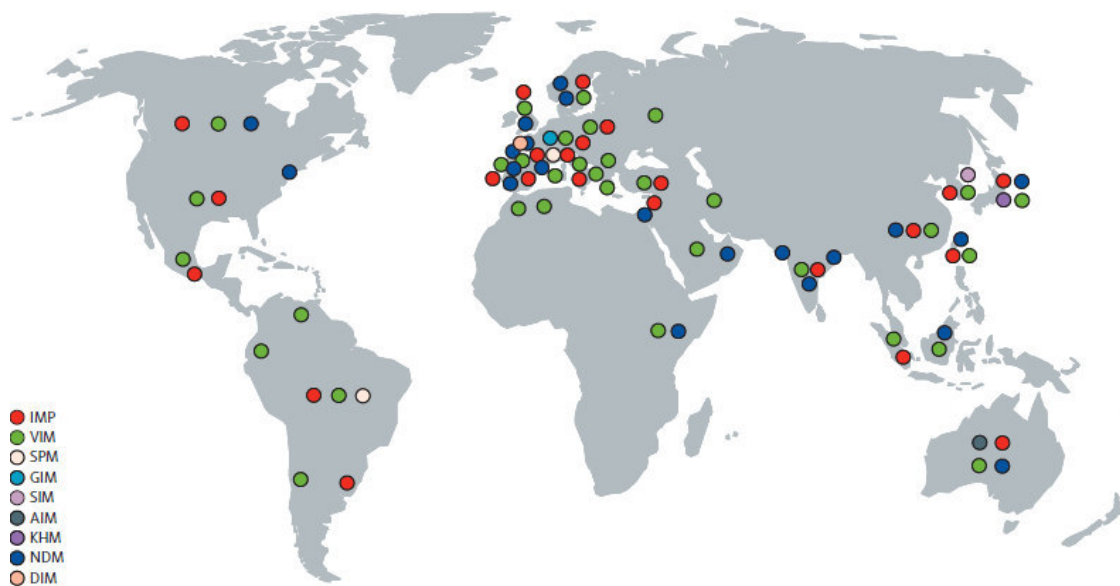


Figura 2: Distribución mundial de las diferentes Metallo-β-lactamasas (Lancet Infect. Dis. 2011; 11 (5) 381 – 393)

La primera MBL, nombrada como IMP-1, fue reportada en Japón en 1991 en *Pseudomonas aeruginosa* cepa GN17203; el gen que la codifica, *bla*_{IMP}, fue encontrado en un plásmido que podía movilizarse a otras cepas de *Pseudomonas*.³ IMP-1 presenta un patrón de resistencia amplio que incluye cefalosporinas de espectro extendido, carbapenemes e inhibidores de β-lactámicos como ácido clavulánico y sulbactam. Inicialmente las MBL tipo IMP fueron confinadas exclusivamente a Japón y algunos pocos países en el Sudeste de Asia, hoy en día han sido reportados alrededor del mundo en países como: China, Australia, Estados Unidos, Canadá, Argentina, Brasil y ocasionalmente en Inglaterra, Italia y Portugal.⁵⁰ Más de 20 tipos diferentes de MBL tipo IMP han sido descritas; con frecuencia tienen una distribución geográfica definida, a pesar de que algunos (por ejemplo IMP-1, IMP-4 e IMP-7) han sido detectadas en diferentes áreas geográficas lo que demuestra su potencial para extenderse intercontinentalmente.³⁹ A pesar de la gran cantidad MBL tipo IMP diferentes a IMP-1, estos no han dominado el escenario global en lo que respecta a MBL, sólo han aparecido brotes esporádicos; IMP-1 continua siendo la dominante en Japón a más de 20 años de sus descubrimiento.³⁷ Las MBL tipo IMP han sido detectadas principalmente en *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Providencia rettgeri*, *Morganella morganii* y *Alcaligenes spp.*⁵⁰

La Metallo- β -lactamasa Imipenemasa Verona (VIM), codificada por el gen *bla*_{VIM}, es el segundo grupo dominante de las MBL adquiridas. VIM-1 fue identificado inicialmente en Verona, Italia, en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* responsable de un brote nosocomial en 1997.⁵¹ Existen más de 25 variantes diferentes de MBL tipo VIM, pero el dominante es VIM-2 el cual se encuentra establecido en los 5 continentes y cuyo gen se encuentra generalmente localizado en el cromosoma y no en plásmidos. Todas las variantes de VIM, codificadas por el gen *bla*_{VIM} pueden ser llevadas como gen cassette dentro de un Integron de Clase 1.³⁷ Los primeros reportes fueron del Sur de Europa (Francia, Italia y Grecia) y fueron seguidos por reportes de otros países europeos como Polonia, Portugal, España, Suecia, Hungría, Croacia y Alemania. Hoy en día la MBL tipo VIM se ha establecido no sólo en Europa, sino también en Korea, Australia, India, Irán y países de Norte América y Sudamérica.⁵⁰ VIM-1 y VIM-2 tienen una distribución más amplia que las enzimas tipo IMP, enfatizando su remarcable tendencia a diseminarse.³⁹ VIM se encuentra predominantemente en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* pero también han sido detectadas en *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli*.⁵⁰

La Metallo- β -lactamasa New Delhi (NDM) es una de las últimas adiciones en la clasificación de MBL adquiridas. NDM-1 fue reportado inicialmente en el 2009 en un paciente que viajó a New Delhi (India) el cual adquirió una infección en el tracto urinario por una cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a todos los antibióticos excepto colistina. El gen que codifica la enzima NDM-1, *bla*_{NDM-1}, fue localizado en un plásmido largo de 180 kb el cual es fácilmente transferible.⁵² El plásmido que lleva el gen *bla*_{NDM-1} también lleva genes que confieren resistencia a macrólidos, aminoglucósidos, rifampicina, sulfametoxazol y aztreonam. Algunos aislamientos en India han sido reportados como resistentes a colistina y tigerciclina, haciéndolos pan resistentes.³⁷ En la actualidad NDM-1 ha sido reportado alrededor del mundo, en Reino Unido, Estados Unidos, Canadá, Israel, Turquía, China, India, Australia, Francia, Japón, Kenia, Singapur, Taiwán; algunos estudios identificaron aislamientos productores de NDM-1 en pacientes de diferentes países localizados en la región de los Balcanes (Montenegro, Serbia, Kosovo) por lo que esta región podría constituir un reservorio secundario. El primer reporte de NDM-1 en Latinoamérica fue en el 2011 en 2 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* procedentes de un Hospital de Guatemala.⁵³

La prevalencia en India es de 2-8% y se estima que la diseminación de este gen puede llegar a ser global.⁵⁴ Aislamientos de bacterias portadoras del gen *bla*_{NDM-1} han sido reportadas simultáneamente en diferentes países en un periodo de tiempo más corto que las otras MBL.^{39,55} NDM-1 ha sido detectada principalmente en Enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter*, *cloacae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* y *Providencia spp* y en bacilos Gram negativos no fermentadores como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*.⁵⁶

Los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de MBL han sido asociados a falla de terapia con carbapenemes y a brotes nosocomiales en centros hospitalarios de diferentes partes del mundo, lo que ilustra la necesidad de poseer estrategias apropiadas para poder controlar la diseminación de estas bacterias MDR.⁵⁷⁻⁵⁹

1.3.1.5. Identificación

La búsqueda de MBL debería realizarse en el laboratorio con propósitos clínicos y epidemiológicos, especialmente en áreas donde han sido reportados aislamientos con MBL adquiridas, por lo que debería establecerse laboratorios de referencias que implementen protocolos de screening, pruebas confirmatorias y estudios de epidemiología molecular.⁶⁰

Las MBL son capaces de hidrolizar todos los antibióticos β -lactámicos excepto monobactamas, como aztreonam, por lo que la sensibilidad a este antibiótico podría ser un buen predictor. Por el contrario, la resistencia a aztreonam en microorganismos resistentes a carbapenemes no descarta la presencia de MBL, ya que pueden sumarse BLEEs que superponen su actividad a la de las MBL.⁶¹ La resistencia a ceftazidima junto con la resistencia a imipenem y/o meropenem puede usarse como criterio para un tamizaje en busca de MBL.⁶² Sin embargo algunos autores sugieren que en los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* que presenten halos de inhibición en imipenem o meropenem de 16 a 21mm, cuando se detecte la posible presencia de carbapenemasa, se informe el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y se advierta de la presencia de la enzima, esto basado en que la adquisición y expresión de

la MBL IMP-13 no confiere resistencia a carbapenemes según los puntos de corte del CLSI.^{61,63}

La detección fenotípica de las MBL puede realizarse en base a la propiedad que tienen estas enzimas de ser inhibidas por la acción de agentes quelantes de cationes divalentes como el EDTA. Una de las pruebas fenotípicas usadas es el método de aproximación de discos que evalúa el sinergismo (propiedad de un antibiótico de potenciar otro) entre los carbapenemes y EDTA o entre ceftazidima y EDTA (**Ver figura 3**). No obstante, se han detectado falsos positivos con *Pseudomonas aeruginosa* y particularmente con *Acinetobacter baumannii* por la actividad intrínseca del EDTA.⁶⁴ El método de aproximación de discos usando ceftazidima como sustrato y un disco con agentes quelantes ha sido usado para evaluar la inhibición de IMP-1, siendo el ácido 2-mercaptopropionico el que dio resultados más claros debido a que bloquea la actividad de IMP-1 fuertemente, incluso a concentraciones bajas; mientras que ceftazidima sería el sustrato más indicado para las pruebas de sinergismo.⁶⁵ En aislamientos productores de MBL que tienen otro mecanismo de resistencia a ceftazidima, una prueba de sinergismo con imipenem puede mostrar resultados positivos mientras que con un disco de ceftazidima no.⁶⁶ La ceftazidima parece ser un mejor sustrato que meropenem para una prueba de aproximación de discos con EDTA, sin embargo se recomienda evaluar ambos simultáneamente.⁶⁷

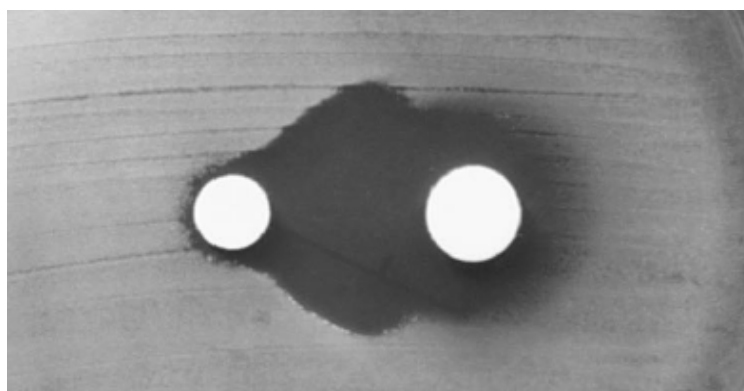


Figura 3: Detección fenotípica de Metallo- β -lactamasas; una zona de inhibición es mostrada entre un disco de imipenem (izquierda) y un disco de EDTA (derecha) por una cepa productora de VIM-2. (Clinical Microbiology and Infection, 2011: 7 (2) 88 – 102)

No hay una combinación perfecta de un inhibidor-betalactámico en el método de aproximación de discos para detectar todas las MBL adquiridas, así como tampoco hay

guías específicas de la CLSI para detectar estas enzimas.^{68,69} La limitación de este método es que las MBL difieren en su nivel de inhibición con ciertos componentes y también varían en su habilidad para conferir resistencia a ceftazidima e imipenem.² En el método de aproximación de discos es importante “acertar” con la distancia entre los discos del carbapenem y el inhibidor, sobre todo en las cepas con baja expresión de MBL en las que los halos de inhibición son amplios, por este motivo existen métodos que incluyen directamente el inhibidor en el mismo disco que el carbapenem.⁶⁴

El método de discos combinados usando un disco de imipenem y adicionando 750µg de EDTA, es un método simple para la detección de MBL, en el cual se compara el halo de inhibición resultante con el que produce el carbapenem solo.⁷⁰⁻⁷³ También se ha propuesto un algoritmo usando discos de meropenem suplementados con ácido dipicolínico para el tamizaje de MBL: este método presentó una sensibilidad de 97% y una especificidad de 81%.⁷⁴

En un estudio comparativo, la prueba de aproximación de discos usando ácido 2-mercaptopropiónico y la prueba de disco combinados usando imipenem y EDTA presentaron 100% de sensibilidad y especificidad. Ambos métodos deberían ser establecidos de acuerdo a la especie bacteriana de estudio y a la prevalencia local de MBL.⁷⁵

Las pruebas fenotípicas descritas, en muchas ocasiones son difíciles y subjetivas de interpretar; una de las dificultades es que el EDTA puede dar resultados falsos positivos modificando la membrana externa en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*⁷⁶, además la concentración de cinc (presente en el agar Mueller-Hinton) ejerce un efecto negativo en la expresión OprD en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a imipenem.⁷⁷

Un método adicional que puede emplearse es el método de Hodge, donde en una placa sembrada con una cepa *E.coli* ATCC 25922 se coloca un disco de imipenem de 10µg al cual llega una estría del aislamiento sospechoso de tener una carbapenemasa: la formación de un halo de inhibición distorsionado se considera como una prueba de Hodge positiva. El método de Hodge seguido de una prueba de aproximación de discos usando EDTA e imipenem puede usarse como tamizaje para detectar la presencia de

MBL como IMP-1, VIM-1 y VIM-2.⁷⁸ Se ha reportado el uso de una cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 que dio mejores resultados que el uso de *E.coli* ATCC 25922.⁷⁹ Existe comercialmente el método de E-test, donde se usa una tira que en un extremo contienen gradientes de imipenem y en el otro extremo gradientes de imipenem con EDTA, por diferencia entre los valores de CMI de imipenem sin y con inhibidor se puede inferir la presencia de las MBL. En un estudio el método de E-test mostró 94% de sensibilidad y 95% de especificidad.⁸⁰ El E-test es simple de realizar pero es caro y tiene sus limitaciones, además se han reportado resultados falsos negativos y falsos positivos.⁸¹

La prueba “estándar de oro” no molecular puede ser establecida en laboratorios de investigación donde extractos crudos de células bacterianas son examinados por su habilidad para hidrolizar carbapenemes. En un estudio esta prueba presentó 100% de sensibilidad y 100% de especificidad.⁸² Los sistemas automatizados de identificación bacteriana como el VITEK 2 o el Phoenix pueden fallar en identificar una MBL.⁸³ Para la confirmación de los genes productores de MBL se requiere de técnicas moleculares específicas que son consideradas los “estándares de oro”.⁸⁴ Una prueba de PCR fue publicada en 1996 para la detección de bacterias Gram negativas productoras de IMP-1⁸⁵ y un esquema de PCR para la identificación de integrones asociados a MBL fue descrito en el 2003.⁸⁶ Desde entonces hay diversas publicaciones donde se han estandarizado pruebas moleculares para la detección de MBL⁸⁷⁻⁹⁰, incluso hay un PCR multiplex comercial.⁹¹

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la frecuencia de los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM} productores de Metallo-β-lactamasas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* no sensibles a carbapenemes.

2.2. Objetivos específicos

Detectar la presencia de los genes productores de Metallo-β-lactamasas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* no sensibles a carbapenemes.

Determinar el perfil de susceptibilidad a antibióticos en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* no sensibles a carbapenemes mediante antibiograma por el método de disco difusión.

Detectar la expresión fenotípica de Metallo-β-lactamasas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* no sensibles a carbapenemes mediante discos de EDTA.

3. MÉTODOS

3.1. TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

3.1.1. Tipo de investigación

Investigación transversal.

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1. Población

Aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* de los siguientes nosocomios:

Hospital Nacional Daniel A. Carrión.

Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins – ESSALUD.

Hospital Alberto Sabogal Sologuren – ESSALUD.

Hospital General FAP.

Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé.

Los aislamientos se almacenaron en el cepario del NAMRU-6 desde julio del 2010 hasta julio del 2012.

3.2.2 Muestra

Ciento cuarenta y nueve (149) aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2.3. Criterios de Inclusión

Aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de muestras clínicas.

Aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes y/o intermedios (no sensibles) a imipenem (IMP) y meropenem (MER) por el método de disco difusión en agar.

3.2.4. Criterios de Exclusión

Aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* contaminados.

Aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* sensibles a imipenem (IMP) y meropenem (MER) por el método de disco difusión en agar.

3.2.5. Tamaño muestral

El tamaño muestral se calculó en base a la frecuencia de los genes en muestras clínicas del Instituto de salud del niño reportado por Gonzales E. en Lima-Perú en el 2011, siendo este valor 10.9%.¹⁷

Usando un nivel de significancia de $p=0.05$ y $Z=1.96$.

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{d^2}$$

Donde:

$$Z = 1.96$$

p = proporción esperada

$$q = 1-p$$

d = precisión

$$n = \frac{(1.96)^2 \times 0.109 \times 0.891}{0.05^2} = 149.237 \approx 149$$

3.2.6. Tipo de muestreo

El tipo de muestreo fue no probabilístico por conveniencia teniendo en cuenta los criterios de selección previamente mencionados.

3.3. VARIABLES

Frecuencia de los Genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM} productores de Metallo- β -lactamasas.

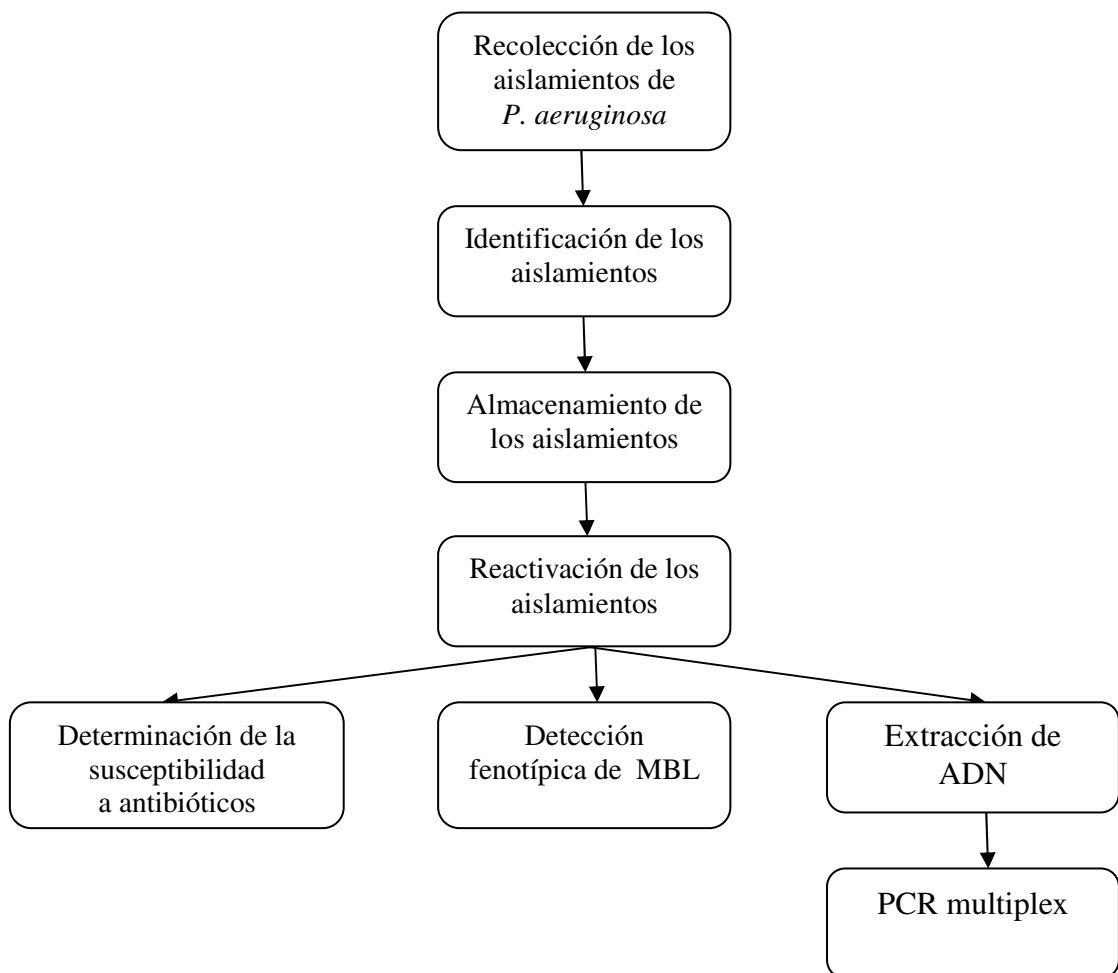
3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN

Antibiograma por Disco Difusión según el Método de “Kirby – Bauer”.

Detección fenotípica de Metallo- β -lactamasas con discos de Acido etilendiaminotetraacético - mercaptoacetato de sodio (EDTA-SMA).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) multiplex.

3.5. PLAN DE PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS



3.5.1. Recolección de los aislamientos

Los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* fueron recolectados de los nosocomios:

Hospital Nacional Daniel A. Carrión,

Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins - ESSALUD

Hospital Alberto Sabogal Sologuren – ESSALUD

Hospital General FAP

Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé

Se usó como medios de transporte agar Tripticasa de Soya (ATS) en viales de 1mL, los cuales fueron trasladados al laboratorio de Bacteriología del NAMRU-6.

3.5.2. Identificación de los aislamientos

A partir del medio de transporte ATS se realizó la siembra de los aislamientos a agar MacConkey. Se confirmó la identificación de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* usando la prueba de oxidasa y los medios de identificación bioquímica: Citrato, Movilidad-Indol-Ornitina (MIO) y Agar Hierro de Kliger (KIA).

3.5.3. Almacenamiento de los aislamientos

A partir del medio diferencial KIA se hizo un pasaje de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* a placas de ATS y se incubaron a 37 °C por 18 a 20 horas. Los aislamientos se suspendieron en 1mL de Caldo Tripticasa de Soya (CTS) con 1.5 % de Glicerol y se almacenaron a -70 °C en crioviales por duplicado (**Ver anexo 2**).

3.5.4. Reactivación de los aislamientos

Los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* fueron descongelados y reactivados mediante siembra en placas ATS y se incubaron a 37 °C por 18 a 20 horas. Posteriormente se utilizaron para los estudios fenotípicos y moleculares.

3.5.5. Determinación de la susceptibilidad a antibióticos

Se determinó la susceptibilidad a antibióticos de cada uno de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* mediante el método de “Kirby – Bauer” (Método de disco - difusión en placa) de acuerdo a los lineamientos de la CLSI usando Agar Mueller-Hinton.⁶⁸ Los antibióticos que se usaron fueron: cefepime 30µg, ceftazidima 30µg, aztreonam 30µg, imipenem 10µg, meropenem 10µg, amikacina 30µg, gentamicina 120µg, ciprofloxacina 5µg, colistina 10µg y piperacilina 100µg / tazobactam 10µg (BBL Sensi-Disc, Becton Dickinson BD, Nueva York). Se utilizó como cepa control una *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Ver anexo 2).

3.5.6. Detección fenotípica de las Metallo-β-lactamasas

Se realizó la detección fenotípica de MBL mediante el método de aproximación de discos de acuerdo a las recomendaciones de la Asociación Argentina de Microbiología.⁶¹ Para realizar este método se usaron discos comerciales de EDTA 372µg - SMA 900 µg (Britania Lab, Lima) alrededor del cual se colocaron discos de ceftazidima, imipenem y meropenem a una distancia de 15mm (centro a centro) para identificar la presencia de una probable MBL en cada uno de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* (Ver anexo 2) .

3.5.7. Detección de los genes codificantes de Metallo-β-lactamasas

Para detectar los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} se usó como muestra ADN total.

Extracción de ADN

Se procedió a extraer el ADN de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* usando el kit de purificación MasterPure™ DNA (Epicentre Biotechnologies, Wisconsin) (Ver anexo 2).

PCR multiplex

Se optimizó un PCR multiplex para detectar los genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}* usando una mezcla de 25 uL con los siguientes componentes: Agua destilada ultra pura libre de ADNasas y ARNasas (Invitrogen, Nueva York), Amplitaq Polimerasa de oro 250 U (Applied Biosystems, New York), primers: IMP-F, IMP-R, VIM-F, VIM-R, NDM-F y NDM-R de 10uM (QUIAGEN, Lima) y ADN 25 ngr (**Ver Anexo 2**).

Se usaron los siguientes pares de primers usados en las publicaciones de Ellington y Poirel.^{92,93}

Gen	Secuencia del primer	Tamaño
<i>bla_{IMP}</i>	IMP-F: 5' -GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC- 3' IMP-R: 3' -GGTTTAAYAAAACAACCACC- 5'	232 pb
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-F: 5' -GATGGTGTTTGGTCGCAT- 3' VIM-R: 3' -CGAATGCGCAGCACCAG- 5'	390 pb
<i>bla_{NDM}</i>	NDM-F: 5' -GGTTTGGCGATCTGGTTTTC- 3' NDM-R: 3' -CGGAATGGCTCATCACGATC- 5'	621 pb

Se uso el Termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Nueva York), siendo las siguientes condiciones de ciclaje las que dieron un mejor resultado: 10 minutos a 95°C, y 36 ciclos de amplificación de 30 segundos a 95°C, 40 segundos a 52°C y 50 segundos a 72°C con una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Se usaron los siguientes controles:

Controles positivos:

Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* portadora del gen *bla_{IMP}* proporcionada por el laboratorio de resistencia de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* portadora del gen *bla_{VIM}* proporcionada por el laboratorio de resistencia de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Klebsiella pneumoniae bla_{NDM} ATCC BAA-2146

Control negativo:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para evidenciar los productos amplificados (**Ver foto 11 del anexo 3**).

3.5.8. Análisis estadístico

Se realizó una prueba de análisis de proporciones donde la regla de decisión fue una prueba de una cola.

La hipótesis nula fue demostrar que la proporción encontrada es menor que la proporción de referencia de 10.9% (Gonzales E. 2011).

Ho: proporción de genes en la población de estudio es menor a 10.9%.

Ha: proporción de genes en la población de estudio es mayor o igual a 10.9%.

Para un nivel de significancia de $p = 0.05$ y $Z=1.64$

La prueba tendrá un nivel de confianza del 95% y un error de 0.05

El análisis estadístico se realizó usando el paquete estadístico STATA versión 11.0 (STATA Corp LP, College station, TX, USA).

3.6. ASPECTOS ÉTICOS

Los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* provinieron de muestras clínicas a las cuales se les realizó cultivo como procedimiento habitual en los laboratorios de Microbiología por lo que no se solicitó la autorización de los pacientes. Durante los procedimientos de este trabajo, la información se maneja de forma confidencial.

4. RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 149 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, procedentes de los nosocomios: Hospital Nacional Daniel A. Carrión, Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins – ESSALUD, Hospital Alberto Sabogal Sologuren – ESSALUD, Hospital General FAP y el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé. La mayoría de aislamientos pertenecieron al Hospital Nacional Daniel A. Carrión.

Los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* provinieron de pacientes hospitalizados y de consulta externa (**Ver tabla 1**). El origen de la mayoría de muestras fue de secreciones bronquiales (**Ver tabla 2**).

Tabla 1. Procedencia de los 149 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*

Hospital de procedencia	Número de aislamientos (n=149)	%	Tipo de pacientes	
			Hospitalizados	Consulta externa
Hosp. Daniel A. Carrión	111	74.5	93	18
Hosp. FAP	9	6	9	0
Hosp. Edgardo Rebagliati Martins	12	8.1	12	0
Hosp. Alberto Sabogal Sologuren	11	7.4	10	1
Hosp. Madre Niño San Bartolomé	6	4	6	0

Tabla 2. Origen por muestras de los 149 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*

Tipo de muestra	Número de aislamientos (n=149)	%
Secreción bronquial	46	30.9
Orina	34	22.8
Secreción	27	18.1
Lavado Traqueal	16	10.7
Secreción de herida	11	7.4
Sangre	8	5.4
Catéter	5	3.4
Espujo	2	1.3

En 28 (18.8%) de los 149 aislamientos estudiados mediante PCR se detectó la presencia del gen *bla_{IMP}* lo que se evidenció mediante una banda de 232pb en el gel de electroforesis (**Ver foto 11 del anexo 3**). No se detectaron los genes *bla_{VIM}* y *bla_{NDM}* (**Ver tabla 3**).

Tabla 3. Detección molecular de genes codificantes de MBL en 149 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*

Gen	Número de aislamientos (n=149)	%
<i>bla_{IMP}</i>	28	18.8
<i>bla_{VIM}</i>	0	0
<i>bla_{NDM}</i>	0	0
Ninguno	121	81.2

Se rechaza la hipótesis nula de que la frecuencia del gen productor de MBL es menor o igual que 10.9% ($p=0.0010$). La frecuencia del gen *bla_{IMP}* es de 18.8% con un intervalo de confianza de 12.5% a 25%, siendo esta diferencia significativa ($p < 0.025$).

En la mayoría de los hospitales se encontró al menos un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* productor de MBL, mientras que en los aislamientos recolectados del hospital San Bartolomé no se encontró ninguno (**Ver tabla 4**). .

Tabla 4. Frecuencia del gen *bla_{IMP}* por hospitales

Hospital	Número de aislamientos (n=149)	Frecuencia del gen <i>bla_{IMP}</i> (%)
Hosp. Daniel A. Carrión	111	11.7
Hosp. FAP	9	55.5
Hosp. Edgardo Rebagliati Martins	12	75
Hosp. Alberto Sabogal Sologuren	11	9
Hosp. Madre Niño San Bartolomé	6	0

El 63.8% de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* fueron MDR. En relación a las cefalosporinas se encontró un 79.2% de aislamientos resistentes a cefepime y el 81.9% fueron resistentes a ceftazidima. En cuanto a los carbapenemes el 98% de los aislamientos fueron resistentes a imipenem y el 2% intermedios, mientras que el 100% fueron resistentes a meropenem. El 100% fue sensible a colistina (**Ver tabla 5**).

Tabla 5. Perfil de susceptibilidad a antibióticos en 149 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibióticos	Sensible (%)	Resistente (%)	Intermedio (%)
Cefepime	11.4	79.2	9.4
Ceftazidima	16.8	81.9	1.3
Aztreonam	11.4	74.5	14.1
Imipenem	0	98	2
Meropenem	0	100	0
Amikacina	16.8	81.9	1.3
Gentamicina	8.7	90.6	0.7
Ciprofloxacina	3.4	95.9	0.7
Colistina	100	0	0
Piperacilina/Tazobactam	12.1	57.0	30.9

Los 28 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* que presentaron el gen *bla_{IMP}* fueron MDR presentando una resistencia marcada a imipenem con un halo de 6mm en el método de disco difusión, además fueron sensibles sólo a colistina. Cinco aislamientos (17.9%) fueron sensibles a aztreonam (**Ver tabla 6**) (**Ver foto 2 del anexo 3**).

Tabla 6. Perfil de susceptibilidad a antibióticos en 28 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de MBL

Antibióticos	Sensible (%)	Resistente (%)	Intermedio (%)
Cefepime	0	100	0
Ceftazidima	0	100	0
Aztreonam	17.9	71.4	10.7
Imipenem	0	100	0
Meropenem	0	100	0
Amikacina	0	100	0
Gentamicina	0	96.4	3.6
Ciprofloxacina	0	100	0
Colistina	100	0	0
Piperacilina/Tazobactam	3.6	67.9	28.5

En la detección fenotípica de las MBL realizada a los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, se detectó su expresión en 26 aislamientos (17.5%) los cuales mostraron un sinergismo al menos con uno de los antibióticos usados como sustrato (Ver **Tabla 7**).

Tabla 7. Detección fenotípica de MBL en 149 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*

Tipos de Sinergia	Número de aislamientos (n=149)	%
Sólo CAZ-EDTA	16	10.7
CAZ-EDTA y IMI-EDTA	5	3.4
CAZ-EDTA y MER-EDTA	5	3.4
Ninguno	123	82.5

5. DISCUSIÓN

La frecuencia del gen *bla*_{IMP} codificante de la MBL tipo IMP en los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* estudiados fue de 18.8% y no se evidenciaron los genes *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM}. La frecuencia de genes productores de MBL en *Pseudomonas aeruginosa* es variable entre diferentes hospitales y países debido a la diversidad de tipos y subtipos de genes existentes, con frecuencias que van de 5.8 a 24.6% en países de América del Sur.^{13,15} La frecuencia del gen *bla*_{IMP} de 18% fue mayor a la reportada en el Instituto de Salud del Niño (10.9%).¹⁷ Asimismo fue mayor a la frecuencia de 5.4% reportada por Martins en el 2007 en Brasil¹⁵ y a la de 13.8% reportada por Cejas en Argentina en el 2008.¹⁶

Se han reportado casos de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de MBL tipo IMP y VIM responsables de brotes en diferentes países del mundo como Grecia, Italia, Korea, China, Canadá, Colombia en los cuales una misma clona era la causante de un brote intrahospitalario.⁵⁷⁻⁵⁹ En este estudio los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* codificantes del gen *bla*_{IMP} procedentes del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins y el Hospital General FAP fueron reportados como brotes intrahospitalarios por lo que se trataría, en cada caso, de la diseminación de un solo tipo de cepa MDR.

La PCR fue estandarizada probando combinaciones diferentes de temperaturas, tiempos, concentraciones de los primers y concentraciones de los ADN. Se usó como referencia los trabajos de Ellington y Poirel. Sólo se modificaron algunos parámetros como el uso de una Amplitaq Polimerasa de oro en lugar de usar los componentes por separado como el Cloruro de Magnesio, dNTPs y además se modificaron algunos volúmenes de reacción.

En la susceptibilidad antimicrobiana se encontró que hubo una mayor resistencia a la ciprofloxacina y a los carbapenemes. El incremento en la resistencia a ciprofloxacina ha sido reportado en hospitales de Estados Unidos de 1997 al 2009.⁹⁴ Los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de MBL fueron MDR, siendo todos clínicamente resistentes a cefepime, ceftazidima, imipenem, meropenem, amikacina y ciprofloxacina; sólo fueron sensibles a colistina, esto concuerda con los reportes de MBL que confieren multidrogoresistencia incluido a carbapenemes en Argentina, Venezuela, Brasil y demás

países de América Latina.²⁸ Sin embargo no se debe descartar la posibilidad de poder encontrar aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de MBL con sensibilidades disminuidas o incluso sensibles a carbapenemes como se ha reportado en Argentina.^{61,63}

Todos los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de MBL tuvieron una resistencia marcada a imipenem con una medida de halo de 6mm. Esto podría ser un indicador para sospechar de la presencia de MBL en los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* circulantes en Lima ya que otros mecanismos de resistencia a carbapenemes en *Pseudomonas aeruginosa* como las bombas de flujo o la pérdida de porinas OprD por si solos no pueden conferir una resistencia a imipenem con halo de 6mm.⁵⁰

Para aztreonam, de los 28 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de MBL sólo fueron sensibles 5 (17.9%), mientras que el resto tuvo susceptibilidad intermedia o resistente. Los 5 aislamientos mencionados tendrían solamente MBL como único mecanismo de resistencia extrínseco para carbapenemes, por lo que en estos casos la sensibilidad al aztreonam sería un buen indicador de la presencia de una MBL. Los 23 aislamientos que no fueron sensibles a aztreonam probablemente tendrían otros mecanismos de resistencia, como por ejemplo una BLEE, por lo tanto la resistencia a aztreonam en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenemes no descartaría la presencia de una MBL.⁶¹

Ceftazidima mostró ser un mejor sustrato para la identificación fenotípica de MBL como lo expone el trabajo de Arakawa⁶⁵, ya que mostró un sinergismo con el EDTA en los aislamientos productores de MBL (**Ver foto 3-5 del anexo 3**).

El uso de imipenem y meropenem ha sido reportado como sustratos para la identificación fenotípica de MBL, sin embargo en el presente trabajo sólo unos pocos aislamientos mostraron una sinergia con el EDTA (**Ver foto 6-8 del anexo 3**), esto puede depender de la variante del gen y a la cantidad de enzima que produce.² Por otro lado hubo dos aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* portadores del gen *bla_{IMP}*, confirmado por PCR, que fueron negativos para la detección fenotípica de MBL mediante la prueba de aproximación de discos usando EDTA, esto podría deberse a una

baja concentración de la enzima o que se necesita una mayor concentración del cofactor (Cinc) para que su actividad se exprese, sin embargo, a pesar de que no se pueda detectar la expresión fenotípica de la enzima, sí se puede detectar el gen que la produce. Hubo varios casos de resultados falsos positivos para esta prueba los cuales fueron considerados desde un inicio como negativos (**Ver foto 9 del anexo 3**). Se han descrito resultados falsos positivos y otros inconvenientes para la detección fenotípica de MBL usando discos de EDTA. ⁶⁴

La limitación del presente trabajo fue que se obtuvieron pocos aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* de la mayoría de hospitales por lo que la frecuencia de genes productores de MBL por hospital no refleja la frecuencia real. En un futuro se podría ampliar el estudio de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* en un número mayor de hospitales, así como buscar una mayor cantidad de genes codificantes de MBL. Además podría realizarse secuenciación de los genes codificantes de MBL con fines epidemiológicos para conocer las diferentes variantes que se circulan en los hospitales.

Los conocimientos de los mecanismos moleculares de resistencia bacteriana proporcionan información importante para que los programas de control de uso de antibióticos y control de infecciones nosocomiales puedan establecer protocolos de vigilancia epidemiológica de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de MBL y una prevención de la diseminación de cepas MDR.

6. CONCLUSIONES

Todos los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de Metallo- β -lactamasas fueron MDR.

La detección de los genes productores de Metallo- β -lactamasas por PCR permitió detectar la frecuencia real de *Pseudomonas aeruginosa* productores de Metallo- β -lactamasas.

La prueba fenotípica para detectar Metallo- β -lactamasas no es concluyente debido a que puede haber falsos positivos y falsos negativos.

7. RECOMENDACIONES

Buscar las Metallo- β -lactamasas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* MDR en los laboratorios de Microbiología.

Implementar pruebas moleculares en los laboratorios de referencia para detectar los genes productores de Metallo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Uniformizar la interpretación de las pruebas fenotípicas para detectar las Metallo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Mantener la permanente vigilancia epidemiológica sobre los casos de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de Metallo- β -lactamasas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. J Hosp Infect. 2009 Dec;73(4):338-44.
2. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev. 2005 Apr;18(2):306-25.
3. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1991 Jan;35(1):147-51.
4. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother. 2002 Nov;50(5):673-9.
5. Mendes RE, Castanheira M, Garcia P, Guzman M, Toleman MA, Walsh TR, et al. First isolation of bla(VIM-2) in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Apr;48(4):1433-4.
6. Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Int J Antimicrob Agents. 2005 Jan;25(1):57-61.
7. Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. Clin Infect Dis. 2005 Aug 15;41 Suppl 4:S276-8.
8. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. J Clin Microbiol. 2004 Nov;42(11):5094-101.
9. Villegas MV, Lolans K, del Rosario Olivera M, Suarez CJ, Correa A, Queenan AM, et al. First detection of metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Jan;50(1):226-9.
10. Pagniez G, Radice M, Cuirolo A, Rodriguez O, Rodriguez H, Vay C, et al. [Prevalence of metallo-beta-lactamase in carbapenem resistant *Pseudomonas*

aeruginosa at a university hospital of Buenos Aires City]. Rev Argent Microbiol. 2006 Jan-Mar;38(1):33-7.

11. Perez IA, Garcia CP, Poggi MH, Braun JS, Castillo VC, Roman JC, et al. [Presence of metallo beta-lactamases in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*]. Rev Med Chil. 2008 Apr;136(4):423-32.
12. Guevara A, de Waard J, Araque M. [blaVIM-2 gene detection in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in an intensive care unit in Ciudad Bolivar, Venezuela]. Rev Chilena Infectol. 2009 Aug;26(4):336-41.
13. Franco MR, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. Clinics (Sao Paulo). 2010;65(9):825-9.
14. Ingold AJ, Castro M, Nabon A, Borthagaray G, Marquez C. [VIM-2 metallo-beta-lactamase gene detection in a class 1 integron associated to bla(CTX-M-2) in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Uruguay: first communication]. Rev Argent Microbiol. 2011 Jul-Sep;43(3):198-202.
15. Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. Infection. 2007 Dec;35(6):457-60.
16. Cejas D, Almuzara M, Santella G, Tuduri A, Palombarani S, Figueroa S, et al. [Phenotypic and genotypic characterization of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a Buenos Aires hospital]. Rev Argent Microbiol. 2008 Oct-Dec;40(4):238-45.
17. Gonzales E, Radice M, Gurkind G. Detección Molecular de Metallo-β-lactamasas en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* en un Instituto especializado pediátrico, Lima-Perú [Presentado en el XII Congreso Peruano de Enfermedades Infecciosas y Tropicales; 2011 set. 8-11; Lima, Perú].
18. Palleroni NJ. The *Pseudomonas* story. Environ Microbiol. 2010 Jun;12(6):1377-83.
19. Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM. Bergey's manual of systematic bacteriology / George M. Garrity, editor-in-chief. 2nd ed. New York: Springer; 2001.
20. Palleroni NJ, Ballard RW, Ralston E, Doudoroff M. Deoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. J Bacteriol. 1972 Apr;110(1):1-11.
21. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 6th ed. Philadelphia: Mosby/Elsevier; 2009.

22. Koneman EW. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1997.
23. Willey JM, Sherwood L, Woolverton CJ, Prescott LM. Prescott's principles of microbiology. 1st ed. Boston: McGraw-Hill Higher Education; 2009.
24. Murray PR, Baron EJ. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2007.
25. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier; 2010.
26. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clin Infect Dis. 2005 Sep 15;41(6):848-54.
27. Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res. 2010 Aug;10(4):441-51.
28. Breidenstein EB, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends Microbiol. 2011 Aug;19(8):419-26.
29. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. Front Microbiol. 2011;2:65.
30. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev. 2009 Oct;22(4):582-610.
31. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs. 2007;67(3):351-68.
32. Giamarellou H, Poulakou G. Multidrug-resistant Gram-negative infections: what are the treatment options? Drugs. 2009 Oct 1;69(14):1879-901.
33. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, et al. Comparative review of the carbapenems. Drugs. 2007;67(7):1027-52.
34. Pai H, Kim J, Lee JH, Choe KW, Gotoh N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Feb;45(2):480-4.
35. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Mar;54(3):969-76.

36. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Jun;39(6):1211-33.
37. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Nov;36 Suppl 3:S8-14.
38. Juan Nicolau C, Oliver A. [Carbapenemases in *Pseudomonas spp*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010 Jan;28 Suppl 1:19-28.
39. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis*. 2011 May;11(5):381-93.
40. Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol*. 2006 Sep;14(9):413-20.
41. Laupland KB, Parkins MD, Church DL, Gregson DB, Louie TJ, Conly JM, et al. Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallo-beta-lactamase (MBL)-producing strains. *J Infect Dis*. 2005 Nov 1;192(9):1606-12.
42. Zavascki AP, Barth AL, Goncalves AL, Moro AL, Fernandes JF, Martins AF, et al. The influence of metallo-beta-lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Aug;58(2):387-92.
43. Bebrone C. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol*. 2007 Dec 15;74(12):1686-701.
44. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Feb;41(2):223-32.
45. Bush K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis*. 1998 Aug;27 Suppl 1:S48-53.
46. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol*. 1995 Feb;15(4):593-600.
47. Walsh TR. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Nov;11 Suppl 6:2-9.
48. Bennett PM. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 1999 Jan;43(1):1-4.
49. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Dec;48(12):4654-61.

50. Maltezou HC. Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? *Int J Antimicrob Agents*. 2009 May;33(5):405 e1-7.
51. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jul;43(7):1584-90.
52. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Dec;53(12):5046-54.
53. Pasteran F, Alborno E, Faccone D, Gomez S, Valenzuela C, Morales M, et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Jul;67(7):1795-7.
54. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother*. 2011 Apr;66(4):689-92.
55. Poirel L, Hombrouck-Alet C, Freneaux C, Bernabeu S, Nordmann P. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase 1. *Lancet Infect Dis*. 2010 Dec;10(12):832.
56. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol*. 2011 Dec;19(12):588-95.
57. Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rossolini GM, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis*. 2000 Nov;31(5):1119-25.
58. Pournaras S, Maniati M, Petinaki E, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Legakis NJ, et al. Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo-beta-lactamase gene variants blaVIM-2 and blaVIM-4. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Jun;51(6):1409-14.
59. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MF, Babini GS, Douboyas J, et al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):1290-2.

60. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Canton R, Cauda R, Docquier JD, et al. Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 Apr;29(4):380-8.
61. Radice M, Marin M, Giovanakis M, Vay C, Almuzara M, Limansky A, et al. [Antimicrobial susceptibility testing in clinically relevant non-fermenting gram-negative bacilli: recommendations from the Antimicrobial Agents Subcommittee of the Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología]. *Rev Argent Microbiol*. 2011 Apr-May;43(2):136-53.
62. Samuelsen O, Buaro L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Apr;61(4):827-30.
63. Santella G, Cuirolo A, Almuzara M, Palombarani S, Sly G, Radice M, et al. Full Resistance and decreased susceptibility to carbapenems in IMP-13-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an outbreak. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar;54(3):1381-2.
64. Navarro F, Calvo J, Canton R, Fernandez-Cuenca F, Mirelis B. [Detection of resistance phenotypes in gram-negative bacteria]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011 Aug-Sep;29(7):524-34.
65. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol*. 2000 Jan;38(1):40-3.
66. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol*. 2003 Oct;41(10):4623-9.
67. Noyal MJ, Menezes GA, Harish BN, Sujatha S, Parija SC. Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of nonfermentative Gram-negative bacteria. *Indian J Med Res*. 2009 Jun;129(6):707-12.
68. Clinical and Laboratory Standards Institute / NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI / NCCLS document M100 – S22. Wayne, 2012: 1 - 188

69. Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species*. Expert Opin Investig Drugs. 2008 Feb;17(2):131-43.
70. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* J Clin Microbiol. 2002 Oct;40(10):3798-801.
71. Qu TT, Zhang JL, Wang J, Tao J, Yu YS, Chen YG, et al. Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. J Clin Microbiol. 2009 Apr;47(4):1136-42.
72. Irfan S, Zafar A, Guhar D, Ahsan T, Hasan R. Metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Acinetobacter species* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit patients of a tertiary care hospital. Indian J Med Microbiol. 2008 Jul-Sep;26(3):243-5.
73. Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Sharma V. An evaluation of four different phenotypic techniques for detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. Indian J Med Microbiol. 2008 Jul-Sep;26(3):233-7.
74. Pasteran F, Veliz O, Faccone D, Guerriero L, Rapoport M, Mendez T, et al. A simple test for the detection of KPC and metallo-beta-lactamase carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. Clin Microbiol Infect. 2011 Sep;17(9):1438-41.
75. Picao RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, et al. Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. J Clin Microbiol. 2008 Jun;46(6):2028-37.
76. Ayres HM, Furr JR, Russell AD. Effect of permeabilizers on antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. Lett Appl Microbiol. 1999 Jan;28(1):13-6.
77. Conejo MC, Garcia I, Martinez-Martinez L, Picabea L, Pascual A. Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Jul;47(7):2313-5.
78. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter species*. Clin Microbiol Infect. 2001 Feb;7(2):88-91.

79. Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo-beta-lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. J Clin Microbiol. 2011 Dec;49(12):4301-3.
80. Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. J Clin Microbiol. 2002 Aug;40(8):2755-9.
81. Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004 May;49(1):5-11.
82. Marchiaro P, Mussi MA, Ballerini V, Pasteran F, Viale AM, Vila AJ, et al. Sensitive EDTA-based microbiological assays for detection of metallo-{beta}-lactamases in nonfermentative gram-negative bacteria. J Clin Microbiol. 2005 Nov;43(11):5648-52.
83. Espedido BA, Thomas LC, Iredell JR. Metallo-beta-lactamase or extended-spectrum beta-lactamase: a wolf in sheep's clothing. J Clin Microbiol. 2007 Jun;45(6):2034-6.
84. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol. 2005 Jul;43(7):3129-35.
85. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, et al. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. J Clin Microbiol. 1996 Dec;34(12):2909-13.
86. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. J Clin Microbiol. 2003 Dec;41(12):5407-13.
87. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. J Clin Microbiol. 2007 Feb;45(2):544-7.
88. Motoshima M, Yanagihara K, Yamamoto K, Morinaga Y, Matsuda J, Sugahara K, et al. Quantitative detection of metallo-beta-lactamase of *bla_{IMP}*-cluster-producing *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve

analysis for rapid diagnosis and treatment of nosocomial infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Jun;61(2):222-6.

89. Kruttgen A, Razavi S, Imohl M, Ritter K. Real-time PCR assay and a synthetic positive control for the rapid and sensitive detection of the emerging resistance gene New Delhi Metallo-beta-lactamase-1 (bla(NDM-1)). *Med Microbiol Immunol*. 2011 May;200(2):137-41.

90. Voets GM, Fluit AC, Scharringa J, Cohen Stuart J, Leverstein-van Hall MA. A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum beta-lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC beta-lactamases and OXA beta-lactamases. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Apr;37(4):356-9.

91. Avlami A, Bekris S, Ganteris G, Kraniotaki E, Malamou-Lada E, Orfanidou M, et al. Detection of metallo-beta-lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. *J Microbiol Methods*. 2010 Nov;83(2):185-7.

92. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Feb;59(2):321-2.

93. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 May;70(1):119-23.

94. Master RN, Clark RB, Karlowsky JA, Ramirez J, Bordon JM. Analysis of resistance, cross-resistance and antimicrobial combinations for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 1997 to 2009. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Oct;38(4):291-5.

9. ANEXOS

ANEXO 1

CUADROS

Cuadro 1. Esquema de clasificación de Betalactamasas

Grupo Funcional	Clase molecular	Características
1	C	Cefalosporinasas, resistentes a todos los betalactámicos, sensibles solo carbapenemicos, resistentes ácido clavulanico
2	A, D	Penicilinasas, cefalosporinasas, inhibidas por ácido clavulanico
2a	A	Penicilinasas , inhibidas por ácido clavulanico
2b	A	Betalactamasas amplio espectro TEM-I, SHV-I
2be	A	Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) Resistentes a oxiiminocefalosporinas
2br	A	Betalactamasas IRT Resistente a inhibidores de betalactamasas, excepto tazobactam
2c	A	Enzimas hidrolizantes de carbenicilina
2d	D	Hidrolizantes de cloxacilina u oxacilina.
2e	A	Cefalosporinasas y aztreonamasas , inhibidas por ácido clavulanico
2f	A	Serino- β -lactamasas, carbapenemasas Inhibidas por ácido clavulanico
3a, 3b, 3c	B	Metalo- β -lactamasas Resistencia a carbapenemicos No inhibidas por ácido clavulanico
4	Desconocido	

(Antimicrobial agents and chemotherapy, June 1995, p. 1211–1233)

Cuadro 2. Carbapenemasas en especie de importancia clínica

Organismo	Carbapenemasas		
	Clase A	Clase B (MBL)	Clase D (Oxacilinasas)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	++	++++a	++
<i>Escherichia coli</i>	+/-	+/-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+/-	+/-	+
<i>Serratia marcescens</i>	+/-	+	
<i>Enterobacter spp.</i>	+/-	+	
<i>Citrobacter freundii</i>	+/-	+/-	
<i>Morganella morganii</i>		+/-	
<i>Salmonella enterica</i>	+/-		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+++	+
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+/-	
<i>Acinetobacter baumannii</i>		+	+++
<i>Acinetobacter spp.</i>		+	+

+++ : Prevalencia alta (> 10%) en ciertas regiones

++ : Prevalencia moderada (1-10%)

+ : Prevalencia baja pero > 1 caso

+/- : Casos aislados

(International Journal of Antimicrobial Agents 36S3 (2010) S8–S14)

ANEXO 2

PLAN DE PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS

Criopreservación

Procedimiento:

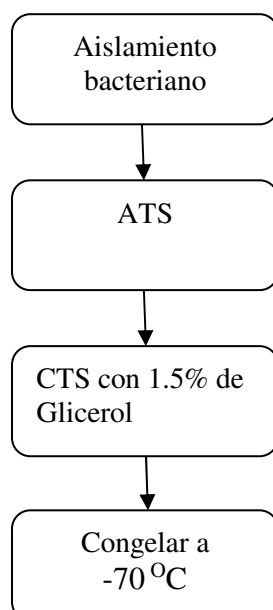
Rotular, por duplicado para cada aislamiento, dos crioviales de 1mL de CTS y 1.5% de glicerol con el código asignado y la fecha de aislamiento.

Hacer un mapa de la caja donde especifique la localización de los crioviales a almacenar.

Usar un asa de siembra en aro esterilizada (con flama de mechero) y extraer una buena cantidad de colonias que han crecido en ATS (sembradas a 37 °C un día anterior), pasarlas a los crioviales de CTS con 1.5% de glicerol.

Homogenizar bien los crioviales con un vortex.

Inmediatamente colocar los crioviales en la caja asignada de acuerdo al mapa de la caja y almacenarlas tan pronto como sea posible a -70 °C.



Susceptibilidad a antibióticos

Procedimiento:

Con un asa de siembra en aro se tomará unas cuantas colonias (sembradas en ATS a 37 °C un día anterior) y serán suspendidas en un tubo de vidrio de 100x75 mm conteniendo 3mL de solución salina esteril. La turbidez se ajustará a una densidad correspondiente a 0.5 en la escala de McFarland.

Introducir un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Girarlo y presionarlo en la pared interior del tubo por encima del nivel de líquido para quitar el exceso de inóculo.

Estriar con el hisopo sobre la superficie seca del agar Mueller-Hinton en tres direcciones rotando la placa 60 grados para asegurar una completa distribución del inóculo. Al final pasar el hisopo alrededor de los bordes de la placa con agar.

Colocar los discos de antibióticos sobre la superficie del agar con una pinza estéril a una distancia no menor a 24mm desde un centro al otro.

Colocar las placas invertidas en una estufa a 37 °C por 16-18 horas.

Lectura:

Transcurrido el tiempo de incubación, cada placa será revisada. El crecimiento de las colonias debe ser confluyente; si hay colonias independientes, el inóculo fue bajo y por tanto se deberá repetir la prueba. La zona de inhibición debe ser uniformemente circular, se medirá en la base de la placa Petri con un vernier el diámetro (en mm) de la zona de inhibición incluyendo el diámetro del disco. La lectura obtenida se debe aproximar al valor entero (en mm) más cercano.

Interpretación:

El tamaño de las zonas de inhibición será interpretado de acuerdo a los puntos de corte establecidos por el documento M100-S22 “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing” de la CLSI.

Antimicrobiano	Resistente (R)	Intermedio (I)	Sensible (S)
Cefepime (FEP)	$\leq 14\text{mm}$	15-17mm	$\geq 18\text{mm}$
Ceftazidima(CAZ)	$\leq 14\text{mm}$	15-17mm	$\geq 18\text{mm}$
Aztreonam(ATM)	$\leq 15\text{mm}$	16-21mm	$\geq 22\text{mm}$
Imipenem(IPM)	$\leq 15\text{mm}$	16-18mm	$\geq 19\text{mm}$
Meropenem(MEM)	$\leq 15\text{mm}$	16-18mm	$\geq 19\text{mm}$
Amikacina(AN)	$\leq 14\text{mm}$	15-16mm	$\geq 17\text{mm}$
Gentamicina(GM)	$\leq 12\text{mm}$	13-14mm	$\geq 15\text{mm}$
Ciprofloxacina(CIP)	$\leq 15\text{mm}$	16-20mm	$\geq 21\text{mm}$
Colistina(CL)	$\leq 10\text{mm}$	-	$\geq 11\text{mm}$
Piperacilina / Tazobactam(TZP)	$\leq 14\text{mm}$	15-20mm	$\geq 21\text{mm}$

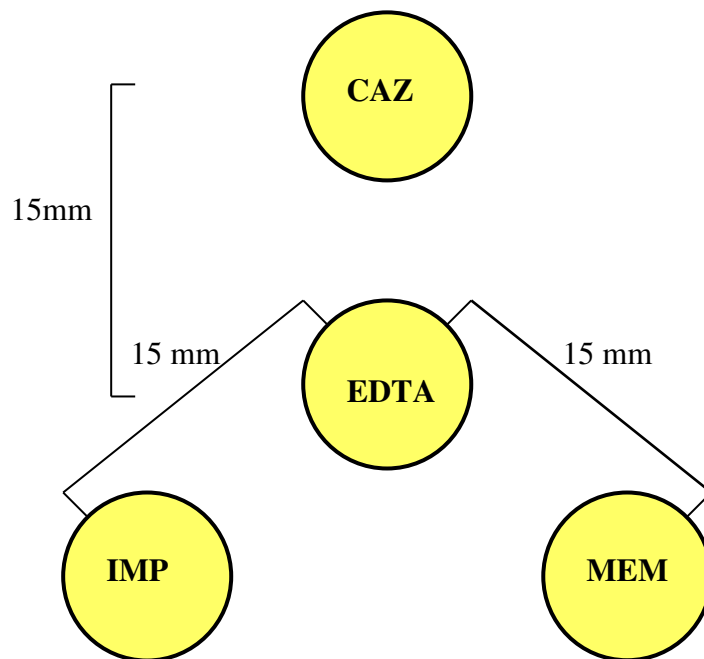
Detección fenotípica de Metallo- β -lactamasas

Procedimiento:

Con un asa de siembra en aro se tomará unas 5 colonias (sembradas en ATS a 37 °C un día anterior) y serán suspendidas en un tubo de vidrio de 100x75 conteniendo 3mL de solución salina esteril. La turbidez se ajustará a una densidad correspondiente a 0.5 en la escala de McFarland.

Introducir un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada, humedecer, girar y presionarlo en la pared interior del tubo por encima del nivel de líquido para quitar el exceso de inóculo.

Estriar con el hisopo sobre la superficie seca del agar Mueller-Hinton en tres direcciones rotando la placa 60 grados para asegurar una completa distribución del inóculo. Al final pasar el hisopo alrededor de los bordes de la placa con agar. Usando una pinza estéril, colocar sobre la superficie del agar el disco de EDTA y alrededor colocar los discos de ceftazidima, imipenem y meropenem a una distancia de 1.5mm centro a centro al disco de EDTA.



Interpretación:

Se considera una resultado positivo cuando se observa un agrandamiento o deformación de la zona de inhibición del desarrollo alrededor de uno de los discos de ceftazidima, imipenem o meropenem hacia el disco de EDTA.

Extracción de ADN

Procedimiento:

Con un asa de siembra en aro se tomará una asada de colonias (sembradas en ATS a 37°C un día anterior) y colocarlas en un tubo de microcentrifuga de 1.5mL con 100uL de agua para PCR, vortexear por unos segundos.

Agregar 300uL de la solución de lisis celular y tisular y agregar 1uL de proteinasa K (conservado a -20°C). Vortexear por unos 10 segundos suavemente.

Incubar a 65 °C por 15 minutos, vortexeando cada 5 minutos. Retirar los viales hasta que alcancen la temperatura ambiente.

Agregar 1uL de ARNasa (5ug/uL) (conservado a -20 °C). Vortexear por unos 10 segundos suavemente.

Incubar a 37 °C por 30 minutos. Retirar los viales y colocarlos en hielo de 3 - 5 minutos.

Agregar 175uL del reactivo de precipitación de proteínas y vortexear rigurosamente. Centrifugar a 10000g a 4 °C por 10 minutos.

Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrifuga de 1.5mL y agregar 500uL de isopropanol. Invertir el tubo unas 40 veces. Centrifugar a 10000g a 4 °C por 10 minutos.

Cuidadosamente remover el isopropanol sin deshacer el pellet de ADN. Lavar con 100uL de etanol al 70%. Centrifugar a 10000g a 4 °C por 5 minutos y esperar a que el etanol se evapore.

Resuspender el ADN con 50uL de Buffer TE y guardarlo a -20 °C hasta su uso.

PCR multiplex

Procedimiento:

En una cabina de nivel 1, realizar una mezcla maestra en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5mL de acuerdo al siguiente protocolo:

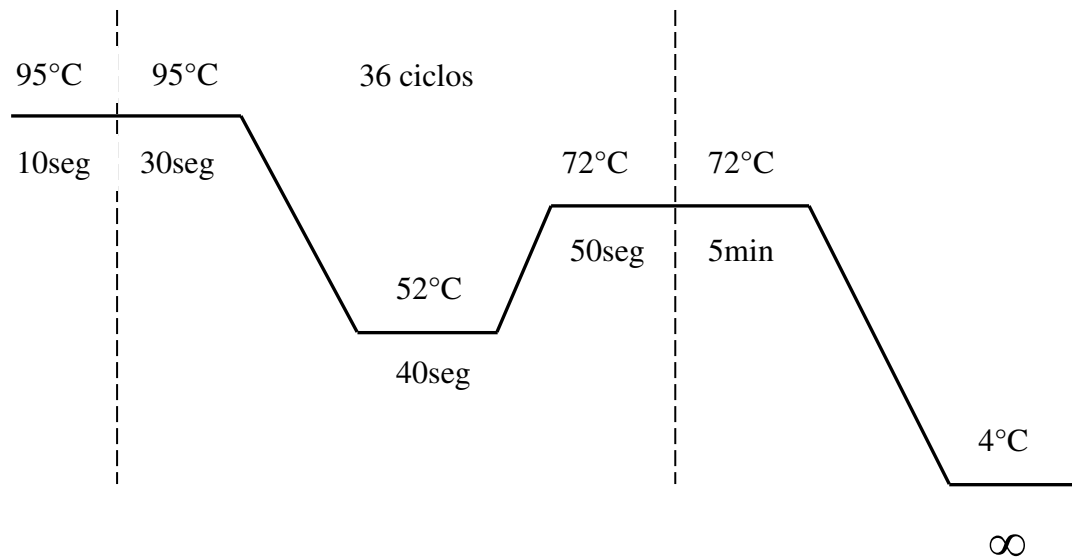
Componentes	Volumen (uL)	Volumen final (uL)*
Amplitaq Gold PCR Master mix	12.5	
IMP-F (10uM)	0.75	
IMP-R (10uM)	0.75	
VIM-F (10uM)	0.75	
VIM-R (10uM)	0.75	
NDM-F (10uM)	0.75	
NDM-R (10uM)	0.75	
Agua destilada (libre de ARNasas)	5.5	
Total	22.5	

*El volumen final depende del número de reacciones de PCR a realizar

Vortexear y repartir 22.5uL en tubos de PCR estériles de 0.2mL

En una cabina de nivel 2, agregar a cada tubo de PCR, 2.5uL del ADN extraído. Para cada reacción de PCR se usan 3 controles positivos y un control negativo.

Usar las siguientes condiciones de ciclaje: 10 minutos a 95°C, y 36 ciclos de amplificación de 30 segundos a 95°C, 40 segundos a 52°C y 50 segundos a 72°C con una extensión final de 5 minutos a 72°C.



Los fragmentos de ADN son analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% marcado con SYBR® safe (15uL) a 120V por 85 minutos en Buffer TBE 1X. Cada pozo del gel debe de cargarse con una mezcla de 2uL del colorante de carga con 8uL del producto del PCR multiplex.

Colocar el gel en el transiluminador ChemiDoc™ XR+ usando una longiud de onda de 302nm. La imagen es captada por la cámara del equipo y digitalizada para que se pueda visualizar.

ANEXO 3

FOTOS



Foto 1: Incubación de placas para la prueba de susceptibilidad a antibióticos de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*.

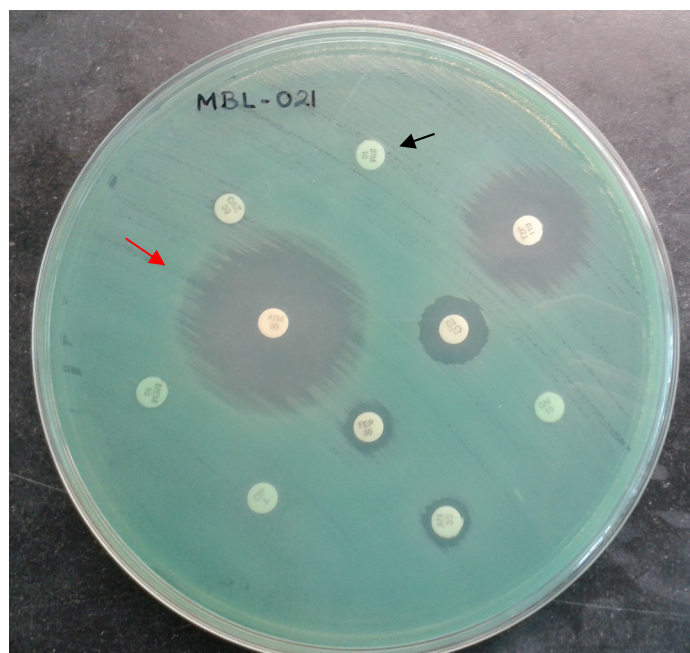


Foto 2: Método de Kirby – Bauer en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* MDR productor de Metallo- β -lactamasa que presenta una resistencia marcada a imipenem de 6mm (flecha negra) y es sensible al aztreonam (ATM) (flecha roja).



Foto 3: Método de aproximación de discos en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* productor de Metallo- β -lactamasa. Se observa claramente un sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ) y EDTA (halo claro).



Foto 4: Método de aproximación de discos en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* productor de Metallo- β -lactamasa. Se observa un sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ) y EDTA.



Foto 5: Método de aproximación de discos en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* productor de Metallo- β -lactamasa. Se observa un sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ) y EDTA.



Foto 6: Método de aproximación de discos en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* productor de Metallo- β -lactamasa. Se observa un sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ), imipenem (IPM) y EDTA.



Foto 7: Método de aproximación de discos en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* productor de Metallo- β -lactamasa. Se observa un sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ), imipenem (IPM) y EDTA.

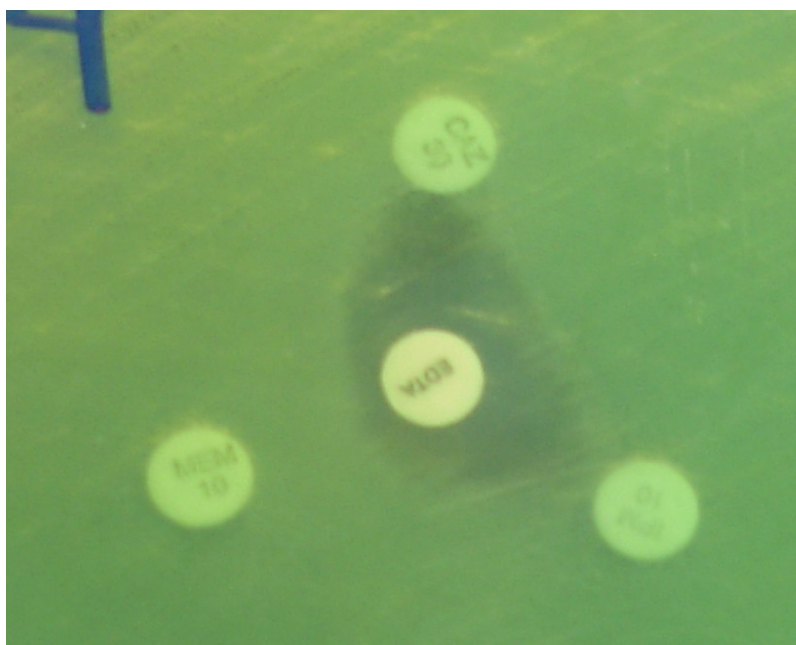


Foto 8: Método de aproximación de discos *Pseudomonas aeruginosa* productor de Metallo- β -lactamasa. Se observa un sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ), imipenem (IPM) y EDTA.

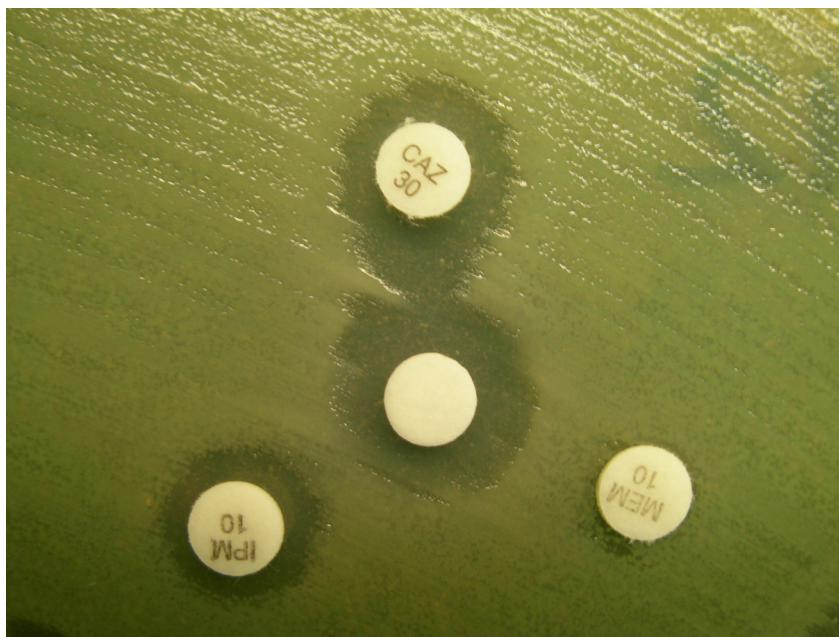


Foto 9: Método de aproximación de discos en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*. Se observa un falso sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ) y EDTA.



Foto 10: Método de aproximación de discos en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*. No se observa sinergismo entre los discos de ceftazidima (CAZ), imipenem (IMI) y meropenem (MEM) con el disco de EDTA.

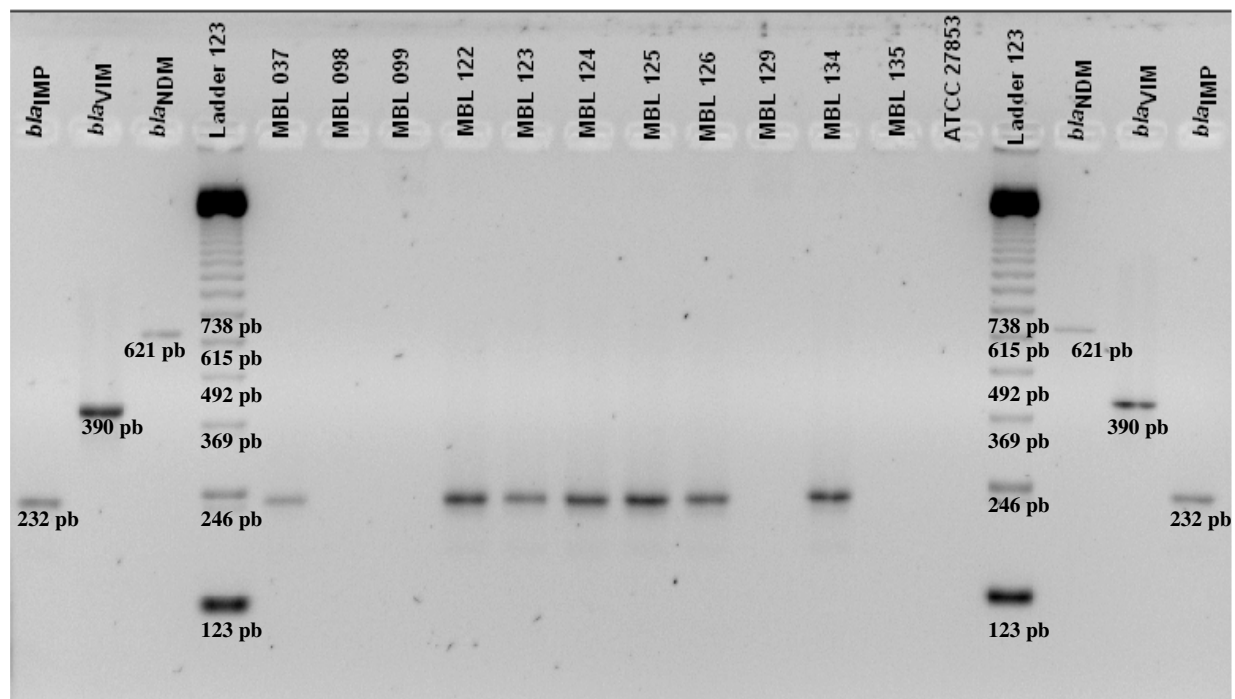


Foto 11: Imagen del gel de electroforesis correspondiente al PCR multiplex. Los amplicones de las muestras (codificadas con las letras MBL) corresponden al gen *bla*_{IMP} de 232 pb. *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM}: Controles positivos. ATCC 27853: Control negativo. Ladder 123: Marcador de peso molecular de 123 bp.

ANEXO 4

MATERIALES

Los siguientes materiales, reactivos y equipos fueron prestados y financiados por el NAMRU-6:

Equipos

Vortex

Congeladora de -70 °C

Incubadoras a 37 °C

Autoclave

Refrigeradoras de 2 – 8 °C

Baño térmico de bloque seco

Espectrofotometro

Cabina de bioseguridad de nivel 1

Cabina de bioseguridad nivel 2

Termociclador Veriti®

Cámaras de electroforesis

Fuente de poder

ChemiDoc™ XR+

Accesorios

Mechero

Asas de siembra en aro y en punta

Escala 0.5 de Mc Farland

Vernier o regla

Micropipetas de 1mL, 200µL, 100µL, 20µL, 10µL

Descartables

Crioviales con CTS + 15% de glicerol

Cajas de crioviales

ATS

Bolsas rojas de desechos

Placas Petri de 15 x 150 mm con Agar Müeller-Hinton

Tubos de ensayo esteriles de 13 x 100 mm con CTS

Discos de suceptibilidad antimicrobiana: Imipenem, meropenem, ceftazidima, piperacilina/ tazobactam, amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, aztreonam, cefepime y colistina.

Tubos de microcentrífuga de 0.2mL y 1.5mL

Tips estériles de 1mL, 200µL, 100µL, 20µL y 10µL

Agarosa

Reactivos

Kit de purificación MasterPure™ DNA: Solución de lisis celular y tisular, ARNasa, proteinasa K, reactivo de precipitación de proteínas y buffer TE

Etanol al 70%

Isopropanol

AmpliTaq Gold Polimerasa

Colorante de carga

SYBR® Safe

Buffer TBE 1X

Marcador de peso molecular de 123pb

ANEXO 5

DATOS Y PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD DE LOS AISLAMIENTOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PRODUCTORES DE METALO- β -LACTAMASAS

Características de los aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>				Diámetros de halos de inhibición en antibiograma(mm) (R: resistente, I: intermedio, S: sensible)									
Código	Hospital	Procedencia	Muestra	FEP	CAZ	ATM	IPM	MEM	AN	GM	CIP	COL	TZP
MBL-004	Carrión	Hospitalario	Orina	6 R	6 R	6 R	6 R	6 R	9 R	6 R	6 R	15 S	10 R
MBL-005	Carrión	Hospitalario	Orina	6 R	6 R	7 R	6 R	6 R	6 R	6 R	6 R	14 S	12 R
MBL-010	Carrión	Hospitalario	Secreción de herida	6 R	6 R	8 R	6 R	6 R	6 R	6 R	6 R	14 S	12 R
MBL-021	Sabogal	Hospitalario	Secreción	6 R	7 R	32 S	6 R	6 R	6 R	6 R	6 R	16 S	24 S
MBL-030	Carrión	Hospitalario	Orina	6 R	6 R	6 R	6 R	6 R	10 R	6 R	6 R	16 S	10 R
MBL-034	Carrión	Hospitalario	Orina	6 R	6 R	6 R	6 R	6 R	8 R	6 R	6 R	16 S	10 R
MBL-037	Rebagliati	Hospitalario	Secreción de herida	6 R	6 R	10 R	6 R	6 R	12 R	8 R	6 R	15 S	9 R
MBL-039	Rebagliati	Hospitalario	Sangre	6 R	6 R	12 R	6 R	6 R	14 R	11 R	6 R	15 S	13 R
MBL-040	Rebagliati	Hospitalario	Orina	6 R	6 R	14 R	6 R	6 R	7 R	6 R	6 R	14 S	13 R
MBL-041	Rebagliati	Hospitalario	Sangre	7 R	6 R	30 S	6 R	6 R	12 R	6 R	6 R	14 S	13 R
MBL-042	Rebagliati	Hospitalario	Sangre	8 R	6 R	17 I	6 R	6 R	7 R	6 R	6 R	14 S	15 I
MBL-043	Rebagliati	Hospitalario	Secreción	7 R	6 R	26 S	6 R	6 R	10 R	6 R	6 R	15 S	11 R
MBL-044	Rebagliati	Hospitalario	Sangre	7 R	6 R	28 S	6 R	6 R	11 R	6 R	6 R	16 S	13 R
MBL-058	Carrión	Hospitalario	Orina	6 R	6 R	7 R	6 R	6 R	7 R	6 R	6 R	15 S	9 R
MBL-063	Rebagliati	Hospitalario	Sangre	8 R	7 R	30 S	6 R	6 R	11 R	6 R	6 R	15 S	17 I

Características de los aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>				Diámetros de halos de inhibición en antibiograma(mm) (R: resistente, I: intermedio, S: sensible)									
Código	Hospital	Procedencia	Muestra	FEP	CAZ	ATM	IPM	MEM	AN	GM	CIP	COL	TZP
MBL-064	Rebagliati	Hospitalario	Sangre	7 R	6 R	17 I	6 R	6 R	7 R	6 R	6 R	15 S	17 I
MBL-106	Carrión	Hospitalario	Secreción bronquial	6 R	6 R	21 I	6 R	6 R	7 R	6 R	6 R	14 S	15 I
MBL-108	Carrión	Hospitalario	Lavado traqueal	6 R	6 R	7 R	6 R	6 R	10 R	6 R	7 R	14 S	7 R
MBL-118	Carrión	Hospitalario	Orina	6 R	6 R	7 R	6 R	6 R	9 R	6 R	6 R	15 S	10 R
MBL-122	FAP	Hospitalario	Secreción de herida	8 R	6 R	11 R	6 R	6 R	12 R	6 R	6 R	13 S	16 I
MBL-123	FAP	Hospitalario	Secreción	9 R	6 R	13 R	6 R	6 R	10 R	6 R	6 R	15 S	20 I
MBL-124	FAP	Hospitalario	Secreción de herida	8 R	6 R	14 R	6 R	6 R	9 R	13 I	6 R	15 S	18 I
MBL-125	FAP	Hospitalario	Orina	6 R	6 R	11 R	6 R	6 R	6 R	6 R	6 R	14 S	14 R
MBL-126	FAP	Hospitalario	Secreción de herida	8 R	6 R	13 R	6 R	6 R	11 R	6 R	6 R	14 S	16 I
MBL-134	Carrión	Hospitalario	Orina	6 R	6 R	11 R	6 R	6 R	8 R	6 R	6 R	15 S	14 R
MBL-144	Carrión	Hospitalario	Secreción	6 R	6 R	7 R	6 R	6 R	9 R	6 R	6 R	14 S	10 R
MBL-146	Carrión	Hospitalario	Secreción	6 R	6 R	9 R	6 R	6 R	10 R	6 R	6 R	14 S	6 R
MBL-148	Carrión	Hospitalario	Secreción	6 R	6 R	7 R	6 R	6 R	9 R	6 R	6 R	13 S	7 R